T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE' DE PİYASAYA SÜRÜLEN SOYA TOHUMLARINDA GDO (GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMA) TARAMASI VE GDO SAPTANAN TOHUMLARA UYGULANAN GIDA PROSESLERİNİN KANTİTATİF ANALİZE ETKİSİ

ALİME GÜL GÖNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEVİL YÜCEL

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE' DE PİYASAYA SÜRÜLEN SOYA TOHUMLARINDA GDO (GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMA) TARAMASI VE GDO SAPTANAN TOHUMLARA UYGULANAN GIDA PROSESLERİNİN KANTİTATİF ANALİZE ETKİSİ

ALİME GÜL GÖNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEVİL YÜCEL

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE' DE PİYASAYA SÜRÜLEN SOYA TOHUMLARINDA GDO (GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMA) TARAMASI VE GDO SAPTANAN TOHUMLARA UYGULANAN GIDA PROSESLERİNİN KANTİTATİF ANALİZE ETKİSİ

Alime Gül GÖNEŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 10.02.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sevil YÜCEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Hikmet BUDAK

Sabancı Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sevil YÜCEL

Yıldız Teknik Üniversitesi ________________________

Prof. Dr. Hikmet BUDAK

Sabancı Üniversitesi ________________________

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi ________________________

Doç. Dr. Mustafa CEMEK

Yıldız Teknik Üniversitesi ________________________

Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul FİLİZ

Düzce Üniversitesi ________________________

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2011-07-04-YULAP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Soya son yıllarda Dünya' da ve Ülkemizde tüketimi giderek artan bir tarım ürünüdür. Pek çok endüstriyel gıda maddelerinin hammaddesi veya yardımcı maddesi olarak kullanılmakta ve tarımı her geçen gün artmaktadır. Sahip olduğu besinsel değer de soyayı günlük diyette oldukça yöntemli bir yere taşımaktadır. Bununla beraber, soya ilk genetiği değiştirilen ürünler arasında yerini almaktadır.

Bu tez çalışmasında, Ülkemizde piyasaya sürülen soya tohumlarında Real-Time PCR kullanılarak GDO taraması yapılmıştır. Ülkemiz kanunları gereğince açık alanda ticari amaçlı GDO tarımı yapmak sınırlandırılmıştır. Ancak kaçak yollarla giren tohumlardan üretim yapıldığı düşünülmektedir. Bu çalışmada Türkiye' nin 14 değişik bölgesinden temin edilen soya tohumlarında GDO analizi yapılmıştır. Buna ilaveten, taraması yapılan GDO pozitif sonuç veren soya tohumlarından elde edilen soyalı bisküvide sıcaklığın GDO miktarına etkisi incelenmiştir.

Tez çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşıp bana yol gösteren değerli hocalarım danışmanım Doç. Dr. Sevil YÜCEL' e ve eş danışmanım Prof. Dr. Hikmet BUDAK' a en içten teşekkürlerimi sunarım. Analiz çalışmalarım boyunca her türlü ilgi ve yardımı gösteren Dr. Fatma AYDINOĞLU' na teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca yardımlarını, katkılarını esirgemeyen ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Sadık GÖNEŞ' e ve öğrenci bir anneye katlanan biricik oğlum Ahmet GÖNEŞ' e teşekkür ederim.

Ocak, 2012

Alime Gül GÖNEŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
µl	Mikrolitre, litrenin milyonda biri
µg	Mikrogram, gramın milyonda biri
Ct	Eşik değere ulaşmak için gerekli döngü sayısı

KISALTMA LİSTESİ

RRS	Roundup Ready Soya
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
NOS	Nopaline Synthase
EPSPS-5	Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase
CTAB	Cetyltrimethyl Ammonium Bromide
CP4ESPS-5	Enolpyruvylshikimate- 3- Phosphate Synthase
TBE	Tris Borikasit EDTA
LEC1	GTGCTACTGACCAAGGCAACTCAGCA
LEC2	GAGGGTTTTGGGGTGCCGTTTTCGTCAAC
GMO09	CATGAAGGACCGGTGGGAGAT
GMO05	CCACTGACGTAAGGGATGACG
GMO08	TGGGGTTTATATGGAAATTGGAA
GMO07	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA
Lec EF	CGCTATTGTGACCTCCTC
Lec ER	GGTTGTTATTTCATCGGTTC
SC EF	GACGCACAATCCCACTATCC
SC ER	CTGTAGCCACTGATGCTGAAA
EN EF	GTGATGAACGGTCTGGAA
EN ER	CAGGCAGCCTTCGTATCG
Lec IF	CTTCTTTCTCGCACCAAT
Lec IR	CTCAACAGCGACGACTTG
SC IF	CGCACAATCCCACTATCCT
SC IR	AGCTTGTCAGCGTGTCCTC
EN IF	AAAACCCTGTCACGGTGGA
EN IR	CAGGCAGCCTTCGTATCG

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

TÜRKİYE’ DE PİYASAYA SÜRÜLEN SOYA TOHUMLARINDA GDO (GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMA) TARAMASI VE GDO SAPTANAN TOHUMLARA UYGULANAN GIDA PROSESLERİNİN KANTİTATİF ANALİZE ETKİSİ

Alime Gül GÖNEŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sevil YÜCEL
Eş Danışman: Prof. Dr. Hikmet BUDAK

Son yıllarda gelişen bilimsel çalışmalarla beraber, dünyanın açlık sorununa çare bulması için tarım ürünlerinin genetiği değiştirilerek daha yüksek verim elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda geliştirilen genetiği değiştirilmiş tarım ürünlerinin başında soya gelmektedir. Bitkinin, herbisitlere daha dayanıklı olması, ürün kalitesinin arttırılması gibi sebeplerle genetiği değiştirilmiştir. Soya uzak doğu ülkelerinde günlük diyetin bir parçasıdır. Zengin protein ve karbonhidrat içeriği ile beslenmede önemli bir yere sahiptir. Soya ürünleri de çeşitli fonksiyonel özellikleri ile önem arz etmektedir, örneğin, inek sütüne alerjisi olanlar veya vejetaryenler için soya sütü ile alternatif bir beslenme kaynağını oluşturmaktadır. Türkiye soya ile yakın bir zamanda tanışmıştır. Birçok bölgemizde soya yetiştirilmektedir. Türk halkı, haber kaynaklarından elde edilen bilgi ışığında soya ve ürünlerinin büyük çoğunluğunun genetiğinin değiştirildiğini düşünmektedir ve bu nedenle soya ürünlerinin kullanıldığı ürünlere şüpheyle yaklaşmaktadır.

Bu amaçla çalışmamızda Türkiye’ nin 14 farklı ilinde piyasaya sürülen soya örneklerinin (Adana, Osmaniye, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş, Elazığ, Şanlıurfa Malatya, Konya, Erzincan, Sakarya, Samsun, Bingöl ve Tekirdağ) ve ayrıca İstanbul-Kuru Gıda Hali’ nden temin edilen 2 adet soya örneğinin GDO taraması yapılmıştır. GDO taramaları Kantitatif Real-Time PCR’ da hibridizasyon probları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Soyada GDO varlığını tanımlayan *35S* promotor ile *NOS* terminatör genleri 7 örnekte (Adana, Hatay, Şanlıurfa, Konya, Sakarya, Bingöl ve Tekirdağ) tespit edilmiştir. Sıcaklığın GDO üzerine

etkisini incelemek amacıyla GDO tespiti yapılan Adana yöresine ait numuneden bisküvi yapılarak 180 ^{o}C’ de 15 dakika pişirilmiştir. Sıcaklığın GDO miktarında yaklaşık %58 oranında azalttığı görülmüştür. Türkiye’ de Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik kapsamında çerçevesinde GDO içeren tarımsal üretim yapılması sınırlandırılmıştır. Çalışmalarımızın sonucunda Türkiye’ de GDO’ lu soya tarımının yapıldığı ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: GDO, *NOS*, Real-Time PCR, Soya, *35S*

ABSTRACT

SCREENING OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS (GMO) IN SOY BEAN SEEDS SOLD IN TURKEY AND THE EFFECT OF FOOD PROSESSES ON QUANTITATIVE ANALYSIS OF GMO DETECTED SEEDS

Alime Gül GÖNEŞ

Department of Biyotechnology
MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Sevil YÜCEL
Co-Advisor: Prof. Dr. Hikmet BUDAK

In recent years, with growing scientific studies, to find a cure for the problem of world hunger, genetically modified agricultural products is to obtain a higher yield. For this purpose, developed genetically modified soybean crops are at the beginnig of. The plant is genetically changed for reasons such as more resistant to herbicide, improving product quality. Soy bean is a part of daily diet for far eastern countries. It has an important place because of rich in protein and carbohydrate content. With various functional properties of soy products is of great importance, for example, soy milk is an alternative source of nutrition for those to allergic to cow’s milk or vegetarians. Turkey has recently met with soy beans that are grown in a lots of our region. But turkish people suspects about soy bean, with the informaiton obtained from news sources, consider that the vast majority of soy beans and soy products are genetically modified.

For this purpose in this study, Turkey's 14 different samples of soybeans sold in the province (Adana, Osmaniye, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş, Ankara, Şanlıurfa, Malatya, Konya, Erzincan, Sakarya, Samsun, Bingöl and Tekirdağ) and also 2 units from the status of İstanbul-dried food center were scanned by GMO. Quantitative Real-Time PCR was carried out using the hybridization probes. *35S* promoter and *NOS* terminator genes that define the presence of GMO have been identified in 7 soy examples (Adana, Hatay, Şanlıurfa, Konya, Sakarya, Bingöl and Tekirdağ). GMO detection to study the effects of temperature on the sample of the biscuits made by using Adana region soybeans and fired at 180 ^{o}C for 15 minutes. Been shown to reduce the

temperature by 58% in the amount of GMO. Turkey in the framework of the Regulation on Genetically Modified Organisms and Products containing GMOs in agricultural production shall be limited. As a result of our work in Turkey GMO soybean cultivation were revealed.

Key words: GMO, Soybean*, NOS*, Real-Time PCR, *35S*

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Bu çalışmada Türkiye’ de soya tarımı yapılan 14 farklı ilden toplanan soya örneklerinde ve 2 adet İstanbul Kuru Gıda Hali’ nden alınan numuneler üzerinde GDO taraması yapılmıştır. Ayrıca sıcaklığın GDO miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu konuda 1999’ dan başlayarak günümüze kadar olan tüm çalışmalar taranmıştır. Genel olarak çalışmaların çoğunlukla Avrupa’ da soya ve mısır üzerine yapıldığı görülmüştür. Etiketleme zorunluluğu olmayan diğer ülkelerde GDO üzerine yapılan çalışmalar daha azdır. Ülkemizde ise çalışmalar yeni başlamış olup bu konuda daha çok domates üzerine çalışmalar yapılmıştır [1], [2]. Mısır ve soya üzerine ithal soyadan üretilen işlenmiş ve işlenmemiş soya ve hayvan yemi örneklerinde [3] tek bir yöreye ait soya örneklerinde [4] çalışmalar yapılmıştır. Türkiye genelinde soya taraması ilk defa tezimizde gerçekleştirilmiştir. Türkiye’ de ve Dünya’ da GDO analize üzerine yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Bogani vd. [5] yapmış oldukları çalışmada, *Agrobacterium sp*. CP4 ‘ den aktarılan glikofosfat herbisit toleranslı %80 GDO’ lu Roundup Ready soya kullanılarak PCR çalışması ile kalitatif bir analiz gerçekleştirilmiştir. Araştırma, aynı tip soyanın 8 farklı proses aşamasında-tohum, ezilmiş tohum, ısıl işlem uygulanmış ezilmiş tohumlar (60 ^{o}C), yağı alınmış ham un, yağı alınmış elenmiş un, ham soya yağı, degummed soya yağı ve lesitin alınan örnekler ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Real-Time PCR ve agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Kalitatif PCR analizi için genetiği değiştirilmemiş soya unu ve %0.1, %0.5, %2, %5 GDO içeren Roundup Ready soya tohumu unu kullanılmıştır. PCR analizinde kullanılan primerler, *35S* promotör, CTP4 bölge ve bölge kodlama CP4

EPSPS'i kapsamaktadır. Çalışma sonunda en az DNA yağ ve lesitinde saptanmıştır. Bu sonuç, yağlardan DNA ekstrakte etmenin zor olmasından da kaynaklanabilmektedir. Jel elektroforezindeki analiz sonucunda yağı alınmış ve elenmiş undaki DNA' da bozulmanın en yüksek olduğu saptanmıştır. Yağ ve lesitinden ekstrakte edilen DNA ise ısıl işlem ve kimyasal proseslerden kaynaklanan aşırı bozulma sebebiyle görünür değildir. PCR uygulamasında ise 188, 195 ve 470 bp DNA parçaları tüm matrikslerde tespit edilmiştir. Ancak daha fazla gıda prosesi geçiren yağı alınmış elenmiş un, yağlar ve lektinde daha uzun parçalar tespit edilememiştir.

Pinto vd. [6], halka arz olunan, pişmeye hazır 10 örneği (3' ü deniz ürünü, 7' si et ürünü olan ve her biri farklı üreticiler tarafından üretilen) toplayarak genetiği değiştirilmiş mısır taraması gerçekleştirmiş olup, Avrupa Birliğinde GDO etiketleme gereksinimlerini belirlemek amacıyla pozitif çıkan örneklerde kantitatif analiz yapmışlardır. Bu amaçla, BT 11, BT 176 ve MON 810 mısır genomlarının tespiti yapılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol için her biri %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içeren Roundup Ready soya (Monsanto, USA), BT 176 (Novartis/Ciba-Geigy, USA), BT 11 (Syngenta, USA), MON 810 (Monsanto, USA) mısır tohumları kullanılmıştır. Uygun pozitif ve negatif kontroller, DNA ekstraksiyonunda ve PCR testlerinde hassasiyet ve tekrarlanabilirlik sağlamak amacıyla tüm analizlere dahil edilmiştir. Taramada *35S* ve *NOS* tabanlı PCR sistemleri kullanılmıştır. Sırasıyla, geleneksel mısır ve diğer türlerde (soya) *ZEİN* geni içermesi ve şablon reaksiyon oluşturması açısından pozitif, negatif (primerlerin özgüllüğünü ve diğer türler ile çapraz reaksiyon oluşmadığını göstermek amacıyla) ve reaktif negatif olarak kullanılmışlardır. PCR uygulamalarında alınan tüm örneklerde GDO tespit edilmiştir. BT 11, BT 176 ve MON 810 genomları sırasıyla 8/10, 3/10 ve 9/10 örnekte tespit edilmiştir. Real-Time PCR ile yapılan kantitatif analiz sonucu ise MON 810 %0.9' dan yukarı, BT 11 miktarı %0.9 daha yüksek ve BT 176 miktarı da %0.9' dan fazla olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber, bu ürünlerin etiket bilgilerinde GDO ile ilgili bir bilgi olmadığı tartışılmıştır.

Brod vd. [7], son yıllarda Brezilya' da tarımsal alanı artan Roundup Ready soyanın ürünlerde kullanımını Nested PCR ile tespit etmek amacıyla; soya içeren, hammadde, yarı mamul ve mamul şeklinde satılan ürünlerde kalitatif GDO analizi yapmışlardır. Bu amaçla, hammadde olarak geleneksel soya ile Roundup Ready soya ezilip elendikten

sonra %0, %0.001, %0.01, %0.1, %1 ve %10 oranlarında karıştırılmıştır. Buna ilave olarak, 6 çeşit soya unu, 6 çeşit, %14 soya proteini içeren bebek maması, 25 farklı soya sütü incelenmiştir. GDO5/GDO9 primerlerinin amplifikasyonun ardından 2 µl PCR ürünü model olarak kullanılarak GDO7/GDO8 primerleri aynı sıcaklık şartlarında 35 döngü ile gerçekleştirilmiştir. RR soya varlığını tespit için Nested PCR 169 bp amplikon ile sonuçlandırılmıştır. Analiz sonucunda, %0 ve %0.01 soya içeren örnekler hariç, %0.01-10 GDO'lu soya içeriği ile hazırlanmış örneklerinin tamamında GDO tespit edilebilmiştir. Nested PCR, bebek mamalarının hiç birinde GDO tespit edememiştir. 6 adet örnekleme yapılan soya ununun 4' ünde, 25 örnekleme yapılan soya sütünün 15' inde GDO varlığı tespit edilmiştir. Çalışma sonunda Nested PCR' ın GDO'lu soya tespitinde yeterli sonuçlar verdiği kanısına varılmıştır

Lee vd. [8], GDO' lu soya ve mısırların Güney Kore' de tarımsal alanlara yayılmasının tespitini Multiplex-PCR kullanarak araştırmışlardır. Bu amaçla, Güney Kore' de soya yetiştirilen 8 bölge belirlenerek 10 ha alan büyüklüğüne sahip 26 alanın yola yakın olan bölgelerinden 260 örnek, yabani olarak yetişen soyalardan 32 örnek toplanmıştır. Bununla beraber, 73 mısır örneği incelenmiştir. Ayrıca, Güney Kore'nin en büyük tahıl ithalat limanı olan Incheon Port' un 3 km yakınında yabani olarak yetişen 18 mısır örneği toplanmıştır. GDO' lu soya tespiti için *35S*, *NOS* ve *LEKTİN*, mısır için *35S*, *NOS* ve *ZEİN* primerleri kullanılmıştır. İncelenen soyaların hiç birinde GDO tespit edilememiştir. Tarımsal alanlardan toplanan mısır örneklerinde de GDO tespit edilememiştir. Ancak limana yakın toplanan 18 örnekten 4' ünde GDO tespiti yapılmıştır. Bu 4 örneğin 3' ünde hem *35S* hem de *NOS* bölgelerine rastlanmıştır, 1' inde ise sadece *35S* promotoru gözlenmiştir.

Malezya'da Abdullah vd. [9], ülkelerinde satılan soya içeren, hammadde, yarı mamul ve nihai ürünlerde PCR yardımıyla GDO taraması yapmışlardır. Bu amaçla süpermarket ve halka açık pazardan topladıkları 85 örneği incelemişlerdir. Referans materyal olarak %0 ve %2 GDO içeren soya tohumları kullanılmıştır. Amplifikasyon *35S, NOS, EPSPS* ve *RRS* ile yapılmıştır. %1.7 agaroz jelli elektroforez ile DNA bantları gözlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada ilk aşamada amplifikasyon inhibisyonu nedeniyle olumlu ve olumsuz sonuçlar arasındaki ayrım için *LEKTİN* geni tespiti yapılmaya çalışılmış, ikinci adım olarak transgenik malzeme örnekleri varlığı için *35S* promotor ve *NOS* terminatör

bölgeleri araştırılmıştır. Son olarak GDO içeren örnekler, özel transgenik malzeme analizine (Roundup Ready Soya özel geni) tabi tutulmuştur. İncelenen 85 soya örneğinin hepsinde *LEKTİN* genine rastlanmıştır. 18’ inde *35S* promotor, *NOS* terminatör ve yapısal gen bölgeleri tespit edilmiştir. GDO tespit edilen 18 örneğin 9’u ham tohum, 8’i tofu ve 1’i de tepmeden (Geleneksel bir Malezya yemeği) oluşmaktadır.

Kakihara vd. [10], ısıl işlem uygulanmış genetiği değiştirilmiş soyada ve fermente edilmiş geleneksel bir Japon yemeği olan Natto’ da rekombinant DNA taraması yapmışlardır. Geleneksel soya unu ve Roundup Ready soya unu karışımları, yüksek basınç altında 121 ^{o}C, 20 dakika ısıl işlem uygulanmıştır. Natto ise %95 GDO’lu soya unu içerecek şekilde hazırlanmıştır. Rafinasyon veya fermantasyon işlemi uygulanan ürünlerde DNA izolasyonu veya tespitinin zor olmasından yola çıkarak çalışmada DNA izolasyonu için CTAB ve alkaline liziz metotları kullanılmıştır. *LEKTİN* geninin tespiti için 118 bp boyutunda LE118 (LE01 ve LE02) PCR primer çiftleri kullanılmıştır. Öncelikle GDO’ lu soyada primer çiftleri arasındaki kavşak bölgesi CTP ve CP4EPSPS tespitine göre tasarlanmış 100, 110, 120, 130, 140 ve 150 bp PCR ürünleri vermişlerdir. Alkalin liziz yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış olan ısıl işlem uygulanmış soya ununda 100, 110, 120, 130, 140 ve 150 bp PCR ürünleri elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezinde tespit edilmiştir. CTAB yöntemi ile her iki örnekten de yapılan DNA ekstraktı bulunan solüsyonlar incelendiğinde hiçbir PCR ürünü tespit edilememiştir. Ardından, *NOS* ve *CP4EPSPS* parçaları arasındaki kavşak bölge yükseltme primer çiftleri kullanılarak PCR dizayn edilmiştir. 100, 110, 120, 130, 140 bp PCR ürünleri elde edilmiştir. Isıl işlem uygulanmış soya unundan CTAB yöntemiyle elde edilmiş ekstrakta 100-140 bp, alkali liziz yöntemiyle elde edilen ekstrakta 100-150 bp, Nattodan CTAB yöntemiyle elde edilmiş ekstrakta 100-130 bp, alkali liziz yöntemiyle elde edilmiş ekstrakta 100-150 bp tespit edilmiştir.

Mouriuchi vd. [11], Japonya’ nın geleneksel ürünlerini hem yarı mamul, hem de nihai ürün şeklinde kalitatif ve kantitatif olarak Real time PCR ile analiz etmişlerdir. Bu çalışma için 6 adet nihai ürün, 10 adet yarı işlenmiş ürün kullanmışlardır. 6 çeşit nihai ürün 3 çeşit karışımdan elde edilmiştir. Bunlardan ilki ve ikincisinin RRS (Roundup Ready Soya) karışım oranları sırasıyla %0.20 ve %0.25; üçüncünün ise (konvansiyonel olan) %61.7‘ dir. Okara ve sıvı soya sütü (100 ^{o}C), Kinugoshi-Tofu, Momen-Tofu, (100 ^{o}C

sonrası 75 ^{o}C), Atsu-Age (100 ^{o}C sonrası 180 ^{o}C), Yuba (100 ^{o}C sonrası 80 ^{o}C) elde edilmiştir. Yarı mamul ürünler ise tofu yapımında ara proseslerden elde edilen demlenmiş soya, tofu çeşidi (go), tofu çeşidi (haşlanmış go), yıkanmış soya küspesi, soya sütü, tofu çeşidi (okara, oboro, momen ve kinogoshi)’ dir. Soyadan genomik DNA, CTAB metoduna ve yarı ve nihai mamullerden ise JAS metoduna göre ekstrakte edilmiştir. Kalitatif ve kantitatif PCR’ da MHLW metoduna göre çalışılmıştır. Kalitatif PCR, tüm örneklerde lektin ve RRS geni tespit etmiştir. Kantitatif analizde ise RRS saptama limiti %0.1 olarak bildirilirken, RRS’ in kantitatif ölçümü için gerekli olan *LEKTİN* geni 20.000’ den fazla olduğu tahmin edilmektedir. İlk numuneden (A) elde edilen RRS içerik sonuçları %0.25-0.31 arasında değişmektedir. Bu oranlar hammadde olarak kullanılan soya içeriğinden (%0.20) daha yüksektir. İkinci numunede (B) ise RRS miktarları %0.21-0.30 arasındadır. B numunesinin analizinde kullanılan soya tohumlarında ise RRS oranları %0.25’ dir. Konvansiyonel soyada ise oran %61.7-69.2 oranları arasındadır. Bu oran hammadde soya (%61.7) ile karşılaştırılınca yüksek bir orandır. Yarı mamul ürünlerin tümünde RRS geni tespit edilmiştir. Demlenmiş soya, go ve okara hariç diğer tüm örneklerde %0.20‘ den fazla RRS içeriği tespit edilmiştir.

Costa vd. [12], yaptıkları çalışmada Roundup Ready (RR) soya varlığını endüstriyel soya yağı üretim prosesi boyunca incelemişlerdir. Bu amaçla, ilk örnek olarak ham soya tohumundan başlamak üzere, çatlatma, yarma, ekstrüksiyon proses adımları boyunca örnek toplanmıştır. Ardından n-hekzan uygulanarak elde edilen ham yağ ve yağdan arta kalan küspesi, ham yağın fosforik asit uygulaması ile elde edilen nötralize yağ, bu yağın 80 ^{o}C’ de yıkanması ile elde edilen yıkama yapılmış yağ, ağartma işlemi uygulanmış (100 ^{o}C) yağ ve son olarak 240 ^{o}C’ de yapılan deodorizasyon sonucu elde edilen nihai ürünlerin tamamı toplanarak analiz edilmiştir. Referans ürün olarak GMO içeriği %0.1, 1, 5 içerikli RRS tohumları kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunda tohum ve türevleri için Wizard, yağ ve türevleri için Nucleospin metotları kullanılmıştır. Elde edilen DNA ekstrüksiyonunun konsantrasyonu ve saflığı nanofotometre kullanılarak, UV spektrofotometrik ölçümü 260 nm (A260) ve A 260/280 absorbans değerlerinde ölçülmüştür. Tohum ve türevlerinde yüksek DNA verimi (71.6-95.7 µg) ve saflık (A260/A280>1.6) elde edilmiştir. Yağ ve türevlerinde ise ham yağda diğerlerine göre daha yüksek DNA verimi (1415 ng) ve yüksek saflık (A260/280=1.95) elde edilmiştir.

Ağartılmış yağda yüksek verim (1625 ng) ancak düşük saflık elde edilmiştir. RR soya tohumları genom ve *NOS* terminatörü için RRS-3J1/RRS-3J3 primerleri dizayn edilmiştir. Kalitatif analiz PCR ve %2 Agaroz Jel Elektroforezi' nde incelenmiş, bununla beraber Real-Time PCR kullanılarak doğrulama yapılmıştır. Soya tohumu türevlerinde lektin gen için GM03/GM04 primerleri kullanılarak yapılan PCR analizinde tüm örnekler için güçlü fragman bantları gözlenmiştir. Yağ türevlerinde ise sadece ham yağda güçlü fragmanlar gözlenmiş diğerlerinde hiçbir PCR ürünü gözlenmemiştir. LE1/LE2 primerleri kullanılarak yapılan analizde ise tüm yağ türevlerinde fragmanlar gözlenmiştir. RRS-3J1/RRS-3J3 primerleri kullanılarak yapılan RR soya tespitinde ham yağ ve deodorize edilmiş yağ hariç hiçbir fragman gözlenmemiştir. Bu durumun diğer yağlarda kaliteli bir DNA ekstraksiyonu yapılmadığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Real-Time PCR ile yapılan analizlerde tohum ve türevlerinde GMO tohum kullanımı ortalama %50.7 olarak tespit edilmiştir. *LEKTİN* geni tüm yağ türevlerinde doğrulanmıştır. RR soya tohumu ham yağ ve nihai üründe tespit edilmiştir. %GMO oranları ham yağ ve deodorize yağ için tespit edilmiş olup diğer yağ türevlerinde tespit edilememiştir.

Zhang vd. [13], Roundup Ready soya varlığını çoklu gıda prosesleri sonucu elde edilmiş 7 örnekte (soya lesitini, soya protein tozu, çikolatalı içecek, ham soya yağı, rafine edilmiş soya yağı ve salataya kullanılan soya yağı), Triplex Nested PCR yardımıyla incelemişlerdir. DNA ekstraksiyonu Wizard protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. PCR için primerler, Primer Premier V5.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk Triplex PCR uygulamasında Lec EF, Lec ER, SC EF, SC ER, EN EF, EN ER şeklinde harici 1. grup primerler dizayn edilmiş olup ikinci PCR uygulaması için Lec IF, Lec IR, SC IF, SC IR, EN IF, EN IR şeklinde dâhili 2. grup primerler dizayn edilmiştir. PCR ürünleri %3 agaroz jel içeren Agaroz Jel Elektroforezi' nde incelenmiştir. Sistem soyada *LEKTİN* geni, *35S* ve *NOS* bölgelerine yönelik kurulmuştur. Hassasiyeti %0.5 olan ilk Triplex PCR uygulaması sonucunda hiç RR soya tespit edilememiştir. İkinci Triplex PCR uygulamasında, hassasiyet %0.005' e yükseltilip, 2. grup primerler kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, rafine edilmiş soya yağı ve salata için kullanılan soya yağı hariç tüm örneklerde *LEKTİN*, *35S* ve *NOS* bölgeleri tespit edilmiştir.

Wurz vd. [14] soyadan üretilmiş örnekler kullanarak, kantitatif GDO tespitinde iki farklı PCR yaklaşımı kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. GDO eşik limitini

belirlemekte oldukça iyi bir yöntem olan çift karşılaştırmalı PCR yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemde *LEKTİN* geni ve RRS DNA miktarları ölçülmüştür. İkinci yöntem ise TaqMan teknik transgenik miktara karşı transgenik olmayan miktar oranını belirlemektedir. DNA ekstraksiyonu Wizard veya CTAB yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Karşılaştırmalı PCR çalışmasında Agaroz Jel Elektroforezi' nde %0.5 GDO içerikli, ikinci olarak %2 GDO içeren Fluka soya incelenmiştir. Örneklerde *LEKTİN* ve RRS için 25,000 kopya, 250 kopya yapılmıştır. Her iki elektroforez jel çıktısının ilk iki bandı (*LEKTİN*) birbiriyle eşleşmiş olup, 25,000 kopya üretilen RRS içeren örnekler için oluşan bantlar orijinal banttan daha güçlü, 250 kopya içeren örneklerde ise daha zayıf gözlenmektedir. TaqMan yönteminde, %0.1 RRS içerikli örnek %0.07, %0.5 içerikli örnek %0.45, %2 içerikli örnek %1.80 ve %1.91, %1 içerikli örnek %0.93 olarak ölçülmüştür

Ajdukovic vd. [15], et ürünlerine soya ve türevlerinin eklenmesinin son yıllarda hayli artış göstermesinden yola çıkarak Novi Sad-Sırbistan' da marketlerden 50 et ürününde RR soya varlığı tespit edilmesi amaçlanmış olup bununla beraber, Avrupa Birliğinin etiketleme zorunluluğu (≥%0.9 GDO varlığı) göz önüne alınıp miktar tayini yapılarak etiketlemenin doğruluğu tayin edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada *35S* promotor bölge ile lektin geni baz alınmıştır. Kalitatif analiz Duplex PCR ve kantitatif analiz Real-Time PCR yardımıyla yapılmıştır. Çalışmada pozitif ve negatif örnek olarak %0.01 ve %1 RR soya ve Bt-11 mısır kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu CTAB metoduna göre yapılmıştır. PCR ürünleri %2 agaroz jel içeren Agaroz Jel Elektroforezi' nde incelenmiştir. Pozitif örnekler *LEKTİN* genine tüm ürünlerde rastlanmıştır. 50 örneğin 12'sinde GDO varlığı tespit edilmiştir. pozitif çıkan örneklerle yapılan kantitatif analizde örneklerin %0.1 ve altında GDO içerdiği tespit edilmiştir.

Forte vd. [16], mısır ve soya tohumlarından elde edilen DNA' dan yararlanarak GDO içeriğini araştırmışlardır. Bu amaçla, Multiplex-PCR kullanarak *35S* promotor, *NOS* terminatör bölgeleri ile *LEKTİN* ve *ZEİN* genlerinde tarama yapmışlardır. Bu çalışmada negatif ve pozitif kontroller için %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içerikli Roundup Ready soya, %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içerikli Bt 176 mısır, %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içerikli Bt 11 mısır, %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içerikli MON 810 mısır kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu Wizard protokolüne göre yapılmıştır. PCR ürünleri %2.5 agaroz jel içeren Agaroz Jel Elektroforezi' nde incelenmiştir. Referans

malzemelere uygulanan M-PCR sistemi beklenen boyutu yalnızca belirli amplikonlarda göstermiştir. %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içerikli Bt 176 ve MON 810 mısırda *ZEİN* amplikonu %2' den %0, *35S* amplikon %2' den %0.1' e kadar tüm örneklerde gözlenmiştir. %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içerikli Roundup Ready soyada *LEKTİN* geni %2' den %0' a, *NOS* ve *35S* amplikonları %2' den %0.5' e kadar tüm örneklerde rastlanmıştır. %0, %0.1, %0.5, %1 ve %2 GDO içerikli Bt 11 mısır örneklerinde *ZEİN* amplikonu %2' den %0' a, *35S* ve *NOS* amplikonları %2' den %0.5' e kadar tüm örneklerde rastlanmıştır. %0 GDO içerikli mısır ve soya örneklerinde sadece *LEKTİN* ve *ZEİN* amplikonları gözlenmiştir.

Ujhelyi vd. [17], Macaristan'da soya türevli ürünlerin GDO içerikleri ve miktarı konusunda bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla marketlerden 251 adet gıda materyali toplayıp bunların 91 tanesini Merkez Gıda Araştırma Enstitüsüne (CFRI) ve 160 adetini Gıda Güvenliği ve Beslenme Ulusal Enstitüsüne (NIFSN) analiz ettirmişlerdir. DNA izolasyonu için Wizard ve CTAP yöntemleri kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunun ardından izolasyonun verimliliği UV spektrofotometrisi ile ölçülmüştür. İzolasyon sırasında çikolata veya çikolata içeren bisküvilerle zorluklar yaşanmış olduğundan araştırmacılar çeşitli literatürlerden yaptıkları araştırmalarda bu durumun ürünün polisakkarid ve polifenol ile tanin içeriğinden kaynaklanmakta olduğunu belirtmişlerdir. 251 adet örneğin 227'sinden kaliteli ve çalışma için yeterli miktarda DNA izole edilebilmiştir. Krema tozları ile çok aşamalı proses geçiren (örn: soya sosu) ve diğer soslardan DNA izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Ardından *LEKTİN* gen taraması yapılmıştır. NIFSN kalitatif Real-Time PCR kullanmıştır. 227 örneğin 208' inde *LEKTİN* geni tespit edilmiştir. *LEKTİN* geni tespiti yapılan örneklerde GDO analizine geçilmiştir. Bunun için *35S* promotor ve *NOS* terminatör bölgeleri temel alınmıştır. CFRI geleneksel PCR kullanmış Örneklerin 80' inde GDO içeriği tespit edilmiştir. 80 örneğin 73' ünde hem *35S* hem de *NOS* bölgeleri saptanmıştır. 7 örnekte ise sadece *35S* promotor bölgesi tespit edilmiştir. Pozitif çıkan örneklerde kantitatif analize geçilmiştir. Kantitatif analiz Real-Time PCR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 39 örnekte RR soya miktarı %0.1 altında, 28 örnekte %0.1-0.9 aralığında, 13' ünde %0.9' dan fazladır. Sonuçlara göre örneklerin %38' inde GDO tespit edilmiş olup bunların %6'sında RR soya miktarı %0.9 oranından yüksektir.

Nikolic’ vd. [18], Sırbistan’ da satılan ithal ürünlerin GDO içerip içermedikleri ve miktarları ile etiketlenmesini teyit amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla Amerika, Avrupa, Almanya, İsviçre, Danimarka, Panama, İsrail ve Brezilya’dan ithal edilen 347 örnek toplanmıştır. Bu örneklerin 237 adeti 2007 yılında, 110 adetini 2006 yılında elde edilmiştir. DNA ekstraksiyonu CTAB metodu ile yapıp ekstrakte edilen DNA’nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometre ile ölçülmüştür. GDO tespit analizini Multipleks PCR yardımı ile *35S* ve *NOS* bölgeleri temel alarak %0.1 duyarlılık ile yapılmıştır. Ayrıca *LEKTİN* geni tespitine gidilmiştir. PCR ürünleri %2’ lik agaroz jel içeren Agaroz Jel Elektroforezi’ nde incelenmiştir. *LEKTİN* geni 318 bp amplikon boyutunda görünerek soya ürünlerinde yapılan DNA ekstraksiyonunun yeterli olduğunu göstermiştir. İncelenen 347 örnekten 39’ u hariç diğerlerinde *35S* ve *NOS* bölgeleri tespiti yapılmıştır. Pozitif çıkan örnekler kantitatif RR soya analizi için Real-Time PCR ‘da incelenmiştir. 2006 yılında toplanmış örneklerden; %0.1‘ in altında RR soya içeren 102, %0.1-0.9 RR soya içeren 6, %0.9’ dan fazla içeren 2 adet tespit edilmiştir. 2007 yılında toplananlar örneklerden; hiç RR içermeyenler 7, %0.1’ in altında içerenler 199, %0.1-0.9 içerenler 23, %0.9’dan fazla içerenler 8 adet olarak tespit edilmiştir. Toplanan örneklerden %11’ inin GDO pozitif verdiği ve bunlardan %3’ünün %0.9’ dan fazla olduğu tespit edilmekle beraber çoğunun GDO yoktur veya organik şeklinde etiketleme yaptıkları gözlenmiştir.

Greiner ve Konietzny [19], 2000 ile 2005 yılları arasında Brezilya’nın Sao Paulo ve Rio de Janeiro bölgelerindeki marketlerden topladıkları işlenmiş gıdalarda GDO içeren soya (Roundup Ready) ve mısır (Bt176 Maximizer, Bt11, MON810 YieldGard, T25 LibertyLink) oranlarının artışını gözledikleri çalışmayı aktarmışlardır. Her yıl marketlerden 100’ er adet soya ve mısır içeren işlenmiş gıdalar toplanıp kantitatif ve kalitatif olarak Real-time PCR ‘ da incelenmiştir. Analiz edilecek ürünler genellikle ithal edilen ürünlerden tercih edilmiş olup soya içeren ürünler; un, unlu gıdalar, soya türevli içecekler, izole soya proteini, bebek yiyecekleri, tatlılar, şekerlemeler, vejetaryen ürünleri, tofu bazlı gıdalar ve hazır çorbalar, mısır için; un, unlu gıdalar, mısır gevrekleri, tortilla, mısır nişastası, bebek gıdaları, tatlılar, hazır çorbalar ve mısır koçanları şeklinde kategorize edilerek analize başlanmıştır. DNA izolasyonu Wizard yöntemine göre yapılmıştır. 2000 yılında analiz edilen ürünlerden %13’ ünün, 2001 yılında %21’ inin,

2002 yılında %24’ ünün, 2003 yılında %36’ sının, 2004 yılında %52’ sinin, 2005 yılında %78’inin RR içerdiği saptanmıştır. 2000 yılında içinde RR tespit edilmiş olan ürünlerden %2’ si, 2001 yılında %3’ ü, 2002 yılında %8’ i, 2003 yılında %14’ ü, 2004 yılında %23’ ü ve 2005 yılında %42’ si, %1’ in altında RR oranına sahiptir. Mısır içeren gıdalardan 2000 yılında incelenenlerden %8’ inin, 2001 yılında %9’ unun, 2002 yılında %6’ sının, 2003 yılında %9’ unun, 2004 yılında %8’ inin ve 2005 yılında %11’ inin GDO’ lu bir mısır türevi içerdiği tespit edilmiştir. 2000 yılında GDO’ lu mısır içeren ürünlerden %2’ si, 2001 yılında %3’ ü, 2002 yılında %1’ i, 2003 ve 2004 yılında %4’ ü, 2005 yılında %6’ sı, %1‘ in altında GDO’ lu mısır içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Dinon vd. [20], yaptıkları çalışmada, 2007-2008 tarihlerinde Brezilya’ da üretilen ve soya içerdiği düşünülen et ürünlerinde ve soya bazlı ürünlerde RR soya tespit ve miktar tayini ile bunların yasal olarak etiketlenmelerini kontrol etmişlerdir. Bu amaçla, Florianopolis, Santa Catarina bölgelerinden 59 örnek (47 adeti işlenmiş et ürünleri, 12 adeti soya bazlı ürünler) toplanmıştır. Toplanan tüm ürünler ülke içerisinde üretilmiştir. Hiç birinin GDO içeriği ile ilgili bir etiketleme söz konusu olmadığı saptanmıştır. Brezilya’ da yasallar gereğince %1 GDO içeriğine sahip ürünler etiketlenmelidir. DNA ekstraksiyonu Lipp et al. (1999) ve Brod et al. (2007) protokollerine göre yapılmıştır. Nested PCR ile *LEKTİN* gen ve *35S* promotor bölgesi taranmıştır. 59 örneğin 54’ ünde *LEKTİN* geni tespit edilmiştir. Araştırmacılar *LEKTİN* geni bulunmayan 5 örnekte (1 sosisli sandviç, 2 piliç mortadella, 1 pişmiş jambon, 1 mortadella) etkin bir DNA izolasyonu gerçekleştiremediklerini düşünmektedirler. 54 örnekten 6’ sında RR tespiti yapılmıştır. Pozitif çıkan örneklerde kantitatif analiz için Real-Time PCR kullanılmıştır. Örneklerin RR soya miktarı 0.1 ile 16.3 g kg^{-1} aralığında olduğu tespit edilmiştir. Örneklerden sadece 1 tanesinin RR içeriğinin 10 g kg^{-1}‘ dan fazla olduğu saptanmıştır. 2007-2008 arasında toplanan örneklerden (54) %11’ i RR içerdiği, bunlardan %2’ sinin RR miktarının %1’ den fazla olduğu hesaplanmıştır.

Vijayakumar vd. [21], basınç ve sıcaklık kullanılarak yapılan gıda proseslerinin DNA fragmanlarına etkisini ve bunların tespitini içeren bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla, mısır (MON-810) ve Roundup Ready soya kullanılmıştır. Tohumlar un haline getirilerek, %1 oranında olacak şekilde geleneksel un ile karıştırılıp ham madde elde edilmiştir. Otoklav işlemi 121 ^{o}C’ de 15 Ibs basınç altında 20 dakika, mikrodalga (MWO)

540W ve 900W dalga boylarında 2 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bununla beraber, %0.67 RR soya ve MON-810 içerikli unlardan 3.5 mm kalınlığında bisküviler yapılarak 180 ^{o}C' de 15 dakika pişirilmiştir. Dondurma işlemi ise -80 ^{o}C' de 48 saat şeklinde gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu Wizard yöntemine göre yapılmıştır. DNA konsantrasyonları spektrofotometre (A260/A280) ile incelenmiş olup ardından %1 agaroz jel içeren Agaroz Jel Elektroforezi' nde incelenmiştir. PCR ürünleri %2 agaroz jel içeren Agaroz Jel Elektroforezi' nde incelenmiştir. MWO ve pişirme (200 mg) işlemi uygulanmış ürünlerden elde edilen DNA miktarı ölçülebilir miktarlarda olup, otoklavlanmış ürünlerden elde edilen ise ölçülebilir miktarlarda olmadığı saptanmıştır. İncelenebilir DNA miktarı ve kalitesi, hiçbir proses uygulanmamış una en yakın sonuç, pişirme işlemi uygulanmış ürünlerde ortaya çıkmıştır. Bununla beraber, dondurma işlemi de DNA kalitesini bozmamıştır. MWO 540W uygulamasında elde edilen DNA miktarı 900W' a göre daha yüksektir. Soya ve mısır için yaklaşık aynı sonuçlar çıkmakla beraber, soyadan elde edilen DNA verimi mısıra göre yüksektir. Hiçbir proses uygulanmamış RR soya ve MON-810 mısır incelendiğinde yüksek yoğunluklu açık bantlar (>3000 bp) bantlar gözlenmiştir. Pişmiş ürünlerin hiç birinde uzun DNA bantları (>3000 bp) gözlenmemiştir. İşlenmiş ürünlerde DNA fragmanları <500 bp boyutlarında gözlenmiş olup bisküvi haline getirilmiş pişirme işlemi uygulanmış ürünlerde diğer proseslere göre incelenebilir DNA miktarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık -pişmiş bisküvi ürünleri hariç- diğer proseslere göre en az hasar MWO uygulanmış ürünlerde (<500bp) saptanmıştır. En fazla DNA parçalanması otoklavlanmış ürünlerde gözlenmektedir. Bununla beraber, düşük sıcaklıkların (-80 ^{o}C) DNA hasarı üzerine hiçbir etkisi olmadığı saptanmıştır.

İncelenen çalışmalar genel olarak soya veya mısır tohumları ile bunları içeren ürünler üzerinde yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Çalışmalarda ürünlerin etiketleme zorunluluğuna uygunluğu tespit edilmeye çalışılmıştır. DNA ekstraksiyonları Wizard veya CTAB protokollerine göre yapılmıştır. GDO tespitinde *35S* promotor ile *NOS* terminatör genlerinden yararlanılmıştır. Çalışmalarda Nested PCR, Multipleks PCR veya Real-Time PCR kullanılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu projenin amacı Ülkemizde her geçen gün ticari değeri ve tüketimi artan soyanın GDO' lu olup olmadığının araştırılması ve gıda proseslerinden sıcaklığın GDO miktarı üzerine etkisinin incelenmesidir.

1.3 Orijinal Katkı

Çalışmada önemli tarım alanlarımızda tahıldan sonra ekim alanı bulan soyanın genetiğinin değiştirilmiş olup olmadığı araştırılmıştır. Ülkemizin bir çok ilinden toplanan tohumların incelendiği bu çalışma ardından yapılacak olan çalışmalar için literatür açısından zengin bir kazanım olacaktır. Ülkemizde piyasaya sürülen soya tohumlarının GDO açısından varlığı analiz edilmiştir. Çalışma etkin bir analiz yöntemi olan Kantitatif Real-Time PCR ve hibridizasyon kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Literatürde, Türkiye' de GDO' ya yönelik çalışmalar incelendiğinde soya tohumlarında GDO taraması ile ilgili kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

GDO içeriğine sahip olan bir hammaddenin endüstriyel kullanımının (bisküvi) ardından içeriğinde oluşacak değişim araştırılmıştır.

BÖLÜM 2

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Doğada kendiliğinden oluşması mümkün olmayan çoğunlukla farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin, genetik mühendislik teknolojisiyle kesilmesine ve elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemlerini kapsayan bir teknolojiye Rekombinant DNA teknolojisi adı verilmektedir [22].

Genetik mühendisliği yöntemleriyle bünyelerine yabancı genler dâhil edilerek genetik yapıları değişikliğe uğratılan ve bu yabancı genleri genomlarına sabit olarak eklenen ve bu özellikleri gösteren bitki, hayvan ve mikroorganizmalar, genetik yapısı değiştirilmiş organizma (GDO) olarak adlandırılmaktadır [23]. Bir organizmanın genetik olarak modifiye edilmesi, o canlının DNA kodunun insan müdahalesi ile doğrudan değiştirilmesi anlamına gelmektedir. Bu değişim genel olarak hedeflenen tek bir özellik için yapılmaktadır [24].

2.1 Tarihçe

İnsanlar yüzyıllar boyunca yetiştirdikleri bitkilerin genetik özelliklerini değiştirmeye çalışmışlar, hızlı büyüme ve büyük tohum gibi özelliklerin eldesi için yabani türleri ıslah amacı ile kullanmışlardır. Genetiği değiştirilmiş organizmaların dünya ticaretine girmesiyle genetik olarak değiştirilmiş tarımsal ürünler daha çok dikkat çekmeye başlamıştır [25].

DNA molekülünün 1953 yılında keşfedilmesi ile gen bilimine yeni bir boyut kazandırılmıştır [31]. İlk rekombinant DNA molekülü 1972'de ligaz enziminin DNA iplikçiğini birleştirmek için kullanılması ile elde edilmiştir. Bunu ilk başarılı DNA

klonlama deneyi izlemiştir. 1972' de ligaz enzimi, DNA iplikçiğini birleştirmek için izole bir restriksiyon enzimi kullanılarak kesilen DNA' lardan hibrid dairesel bir molekül oluşturmak amacı ile kullanılabilmiş ve ilk rekombinant DNA molekülü elde edilmiştir. Bunu, ilk başarılı DNA klonlama deneyi izlemiştir [26].

1974' de, rekombinant DNA yöntemleri ile bir bakteriye aktarılan yabancı bir genin ekspresyonunu açıklayan makale yayınlanmış, rekombinant DNA' nın *Escherichia coli* içerisinde çoğaltılabileceği gösterilmiştir. Daha sonra Cetus firmasındaki araştırmacılar tarafından, DNA zincirini in vitro olarak çoğaltmak için Polimeraz Zincir Reaksiyonu adındaki tekniği geliştirilmiş ve patentlenmiştir. PCR, 1980' lerde, moleküler biyoloji alanındaki en devrimci yeni teknik olarak belirtilmektedir [26].

Stanley Cohen ve Herb Boyer 1980’ li yıllarda insülin üretimini bir bakteriye yaptırmış ve bunu ABD’ de patentleyerek transgenik bakterilerin ilk uygulama alanlarından birisini oluşturmuşlardır [27]. Mikroorganizmalarla ve hayvanlarla yapılan çalışmalarda bitki çalışmaları kadar hızlı ilerlemiş ve ilk genetiği değiştirilmiş hayvan olan fare, Frank Ruddle ve arkadaşları tarafından 1980 yılının başında üretilmiştir. Aynı yıllarda ilk evcil hayvan olarak genetik yapısı değiştirilmiş domuz elde edilmiştir. İnsan ve koyunda süt oluşumun sağlayan genler farelere aktarılarak farelerin genetik yapıları değiştirilmiştir. 1980’ li yılların sonlarına doğru insanda süt oluşumunda rol oynayan genleri taşıyan, Tracy adı verilen ilk transgenik koyun üretilmiştir. Bunu transgenik boğa ve inek takip etmiştir [28].

1980 yılında ABD Yüksek Mahkemesi gen teknolojisine yatırımların büyük bütçeler gerektirmesini gerekçe göstererek, patent korumasını, bitki parçaları, dokuları ve genleri dâhil yeni bitkilere yaygınlaştırılmasın olanak tanımıştır. Bu karardan sonra GDO ticari anlamda gelişme imkânı bulmuştur. Bu karar üzerine, ABD’de Monsanto ve Agrigenetics şirketleri tarafından bitki üzerinde ilk deneysel gen nakli gerçekleştirilmiştir. 1990’lı yıllardın başında ABD’de Calgene firması tarafından ilk ticari transgenik bitki “Flavr Savr – Domates” adıyla piyasaya sürülmüştür [29].

1980’ lerin sonlarına doğru Çin’ de virüslere karşı dirençli tütün ve domates satışı yapılmaya başlamakla beraber 1994 yılına kadar genel bir yetiştirme söz konusu olmamıştır [2]. Ticari anlamda bitkisel üretim ise 1996 yılında başlanmıştır [23].

1997 yılına kadar 35 familyadan 120'nin üzerinde türde transformasyon başarılmıştır ve bunlardan ticari olarak ekimine izin verilen varyeteler Çizelge 2.1'de verilmiştir [30].

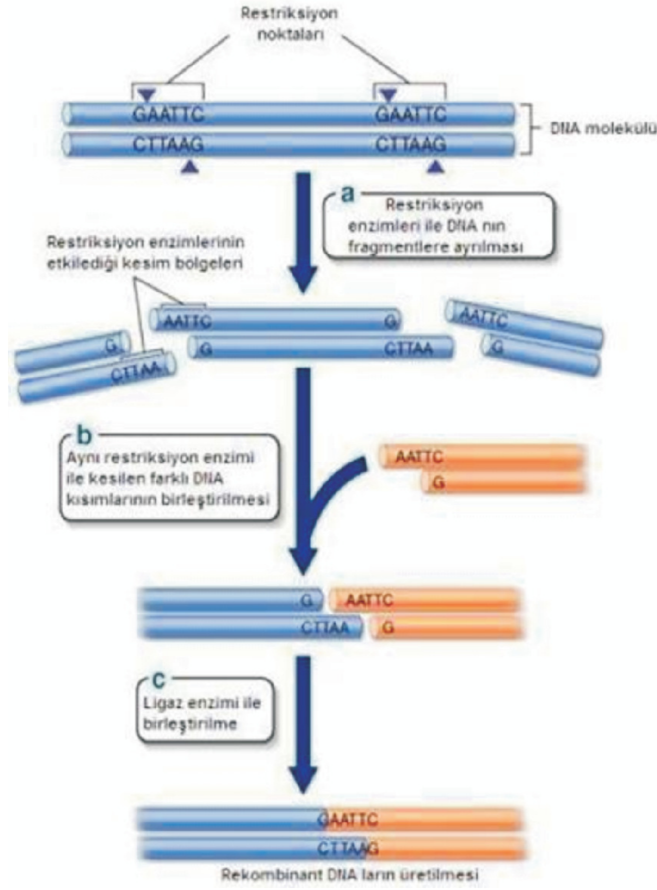
2.2 Bitkilere Gen Transferi

Bitki DNA' sına dışarıdan belirli uzunlukta bir DNA sekansının yerleştirilmesi, yerleştirilen bu parçanın hedef DNA' ya uyum sağlaması ile aktif hale gelerek ekspresyonu ve yeni nesillere aktarılması işlemine gen transferi denilmektedir [30]. Aktarılmak istenen DNA parçasının, bulunduğu canlının DNA'sından DNA kesim enzimleri ile kesilerek izole edilir ve vektör olarak adlandırılan taşıyıcı DNA molekülüne aktarılır. Vektör aktarılacak genle beraber aktarılan geni aktif olarak taşıyan canlıların seçimini sağlayan işaret genleri (özellikle antibiyotik direnç geni) ile aktarılan DNA parçasının aktif hale gelmesini sağlayacak özel gen bölgeleri taşır [31].

Bitkiye gen transferinin en önemli noktası laboratuvar şartlarında gen transferi yapılan bitkinin tek bir hücresinden yeni bitkilerin meydana gelmesidir ki buna totipotensi denilmektedir. Aksi halde kimerik bir organizma meydana gelir ve etkili bir gen transferi gerçekleştirilmiş olmaz. Bu işlem gen transferi yapılan hücrenin doku kültürü tekniği ile çoğaltılması veya direkt olarak bu hücreden yeni bir bitki oluşturulması şeklinde gerçekleşebilir [30].

2.2.1 Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması

Doğada kendiliğinden oluşması mümkün olmayan çoğunlukla farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin, genetik mühendislik teknolojisiyle kesilmesine ve elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemlerini kapsayan teknolojiye Rekombinant DNA teknolojisi denilmektedir. Bu işlem sonucu üretilmiş olan yeni DNA molekülüne rekombinant DNA (rDNA) denilmekte ve Şekil 2.1' de rekombinant DNA üretimi şematize edilmektedir [22].



Şekil 2.1 Rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulması aşamaları [22].

Rekombinant DNA teknolojisi genel olarak 7 temel safhayı içermektedir:

1. Doku ya da hücrelerden DNA izole edilmesi
2. Bu DNA moleküllerinin RE (Restriksiyon Endonükleaz) denilen özel enzimler eklenip aktarılabilecek içerikte kesilmesi
3. RE ile işlem görmüş DNA moleküllerinin vektör adı verilen taşıyıcı moleküller yüklenmesi
4. Vektör ve taşıdığı molekülün faaliyet göstereceği konakçı hücreye nakli
5. Konakçı hücre ve kendi genomu çoğalırken bu arada aktarılan DNA’ da çoğalacağından DNA molekülünün klonlanmasının sağlanışı
6. Klonlanmış DNA’ nın konakçı hücreden izole edilip incelenmesi
7. Klonlanmış DNA’ nın gen ürününün elde edilmesi [32].

Gen aktarımı amacıyla kullanılacak olan DNA parçası aktarılmak istenen gene ek olarak promotor olarak tanımlanan, aktarılması amaçlanan genin bitki hücresinde ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabileceği düzenleyici dizimlere, marker olarak isimlendirilen, gen aktarımı yapılmış hücre veya dokuların ayrılabilmesi için gereken işaret genlerine, reporter olarak adlandırılan, aktarılan genin bitkide işlevsel olduğunun anlaşılmasına yardımcı olan haberci genlere ihtiyaç duyulmaktadır [33].

Bitkilerde kullanılan işaret genleri dominant genlerdir ve bitkinin herbisitlere veya antibiyotiğe direncini sağlarlar [34].

Çizelge 2.1 Gen aktarımında kullanılan seçici marker genler [33]

Marker Gen	**Kodladığı Enzim**	**Kazandırdığı Dayanıklılık**
Antibiyotik NptII	Neomisin fosfotransferaz	Neomisin, Kanamisin
Hpt veya aphIV	Higromisinfosfotransferaz	Higromisin
Dhfr Herbisit	Dihidrofolat redüktaz	Metotreksat
Bar	Fosfinotrisin asetil transferaz	Fosfinotrisin
AroA -	5-fenolpirüvilsikimat 3-fosfat sentaz	Klorosulfuron imidazolanonlar

Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA’ yı kesen yapılardır. Günümüzde 230’ un üzerinde farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000’ den fazla RE varlından söz edilmektedir [34]. Günümüzde 500’den fazla Restriksiyon endonükleaz (RE) ticari olarak üretilmektedir. 10 U/µl konsantrasyonlarda satışa sunulan RE’ lerin bir ünitesi uygun koşullar altında 1 µg DNA’yı bir saatte kesebilen aktivitede enzimlerdir. İzole edilen DNA, RE ile kesilmeden önce jel elektroforezi ile analiz edilmelidir. Kesilecek olan plazmid DNA ‘sı ise plazmidin 2 ya da 3 formunun jel de gözlenmesi gerekmektedir [35].

Rekombinant DNA Teknolojisinde Kullanılan Vektörler

Gen klonlamasında başlıca 4 temel vektörden yararlanılmaktadır [34], [36].

1) Plazmid vektörler

2) Faj vektörler

3) Viral vektörler

4) Bakteriyel vektörler

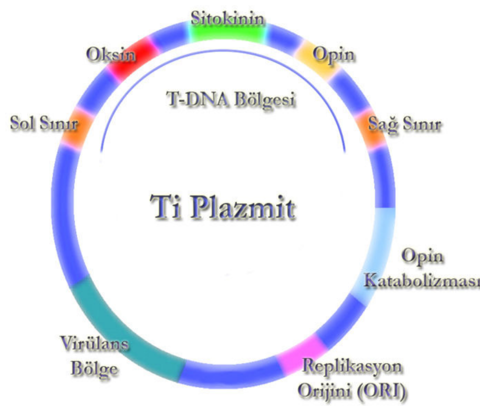
2.2.2 Bitki Hücresine Gen Aktarımında Kullanılan Yöntemler

Bitkilerde gen aktarımı; dolaylı gen aktarımı ve dolaysız gen aktarımı olarak iki kategoride incelenmektedir. Dolaylı gen aktarımı: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, virüsler, RNAi, sperm aracılığı ile dolaysız gen aktarımı: biyolistik, elektroporasyon, mikroenjeksiyon, makroenjeksiyon, agro-enfeksiyon, polen transformasyonu, zigotik embriyoya DNA emdirilmesi, fiberler aracılığı ile DNA aktarımı, sonikasyon, desikasyon, elektroforez ve mikrolazer yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir [33], [34].

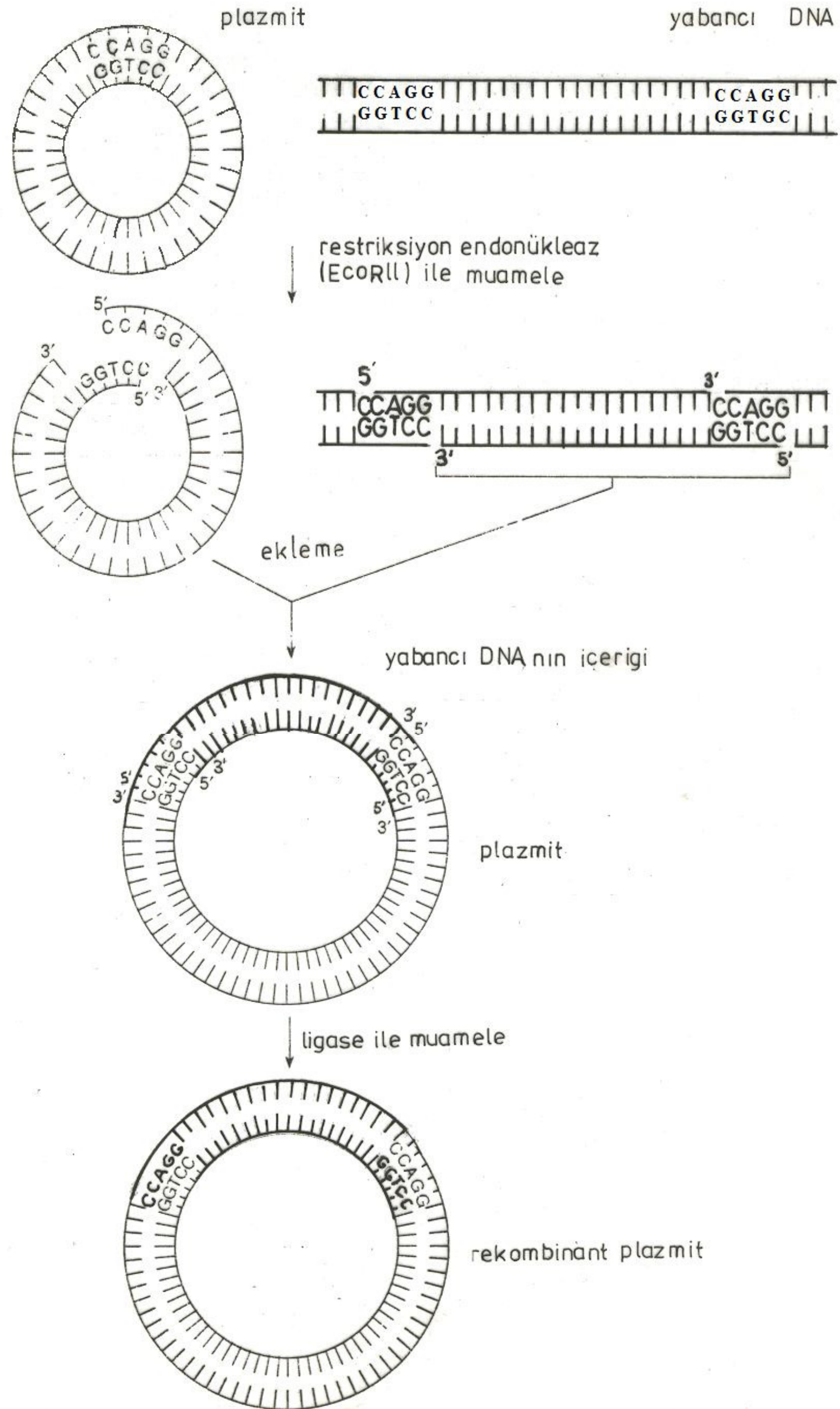
Gen aktarımında kullanılan yöntemler açısından GDO ürünleri incelediğimizde (Çizelge 2.2) 15 farklı uygulama görülmektedir [24].

Agrobacterium Aracılığıyla Gen Transferi

Günümüzde en fazla uygulanan tekniktir. Agrobacterium, Rhizobiacea familyasından gram negatif bir toprak bakterisidir ve iki türü bitkilerde tümör oluşumuna neden olmaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi, genetik materyalini bitki hücrelerine Ti plazmid olarak adlandırılan dairesel bir plazmid yardımı ile aktarmaktadır [34].



Şekil 2.2 Ti plazmid yapısı [34]



Şekil 2.3 Rekombinant plazmidin şekillenmesi. Aynı restriksiyon enzimleri kullanılarak bu örnekte olduğu gibi EcoRI kullanılarak hem konukçu hem de yerleşik DNA kesilir. Aynı anda kesilen uçlar bir araya getirilerek yabancı DNA araya sokulmuş plazmid oluşturulur. Ligaz enzimi ile açıklıklar kapatılır [32].

Çizelge 2.2 GDO Ürünlere gen aktarımında kullanılan yöntemler [24]

Uygulanan Metot
Agrobacterium tumefaciens aracılığı ile bitkinin dönüştürülmesi.
Bitki hücre veya dokusuna mikroparçacık bombardımanı
Geleneksel bitki ıslahı ve seleksiyon
Kimyasal yöntemle oluşturulmuş tohum mutasyonu
Embriyo kültürlerinden somaklonel varyantların seçimi
Doğrudan DNA nakil sistemi
Gelişmemiş embriyonun elektroporasyonu
Özellikleri arttırılmış oleik asitle bir doymuş yağ asidi çözündürücü mutant seçmek ve düşük linoleik asit oluşumu sağlamak için geri melezleme
Kimyasal mutasyonların kombinasyonu, yüksek oleik asit oluşturma başarısı ve tescilli kanola varyeteleriyle geleneksel üretim
Kimyasal mutasyonu izleyen mikrospor kültüründen somaklonal varyantların seçimi
Transgenik kanola T45 hattı ile Inter-spesifik çaprazlama
Transgenik kanola T45 hattı ile Inter-spesifik çaprazlama
Transgenik kanola GT73 hattı ile Inter-spesifik çaprazlama
Bitki hormonu, etilen gibi bir maddenin azaltılması yönünde bir genin genotipe dâhil edilmesi ile olgunlaşmanın geciktirilmesi
Doğal olarak gerçekleşen bir mutasyondan seleksiyon
Protoplastların içerisine kimyasal müdahale ve yeniden geliştirme

Biyolistik Gen Transferi (Partikül Tabancası ile Gen Aktarımı)

Spermidinle 1-2 µm altın veya tungsten partiküllerine tutturulmuş DNA parçalarının bitki hücresine ve dokularına helyum gazı şokuyla bombardımanı şeklinde yapılan bir tekniktir. Bu metotla DNA parçası yerine doğrudan faj, bakteri veya maya hücreleri hedef dokuya transfer edilebilmektedir. Bununla beraber, bu metot, yüksek moleküler ağırlıklı DNA transferinde, DNA izolasyonu ve saflaştırılmasında da kullanılabilmektedir [30], [33], [34].



Şekil 2.4 Biyolistik Cihazı [33]

Protoplastlara Direk Gen transferi (Elektroporasyon ve PEG Aracılığıyla Transformasyon)

Yöntem, hücre protoplast zarı üzerinde DNA moleküllerinin geçebileceği büyüklükte (30 nm) geçici gözenekler oluşturularak aktarılmak istenen DNA parçasının hücreye girmesini sağlamayı amaçlamaktadır. Bunun için, yüksek voltajlı elektrik akımı veya kimyasal maddeler (% 15-25 PEG: polietilen glikol) kullanılmaktadır [30], [34].

Mikro Enjeksiyon

Bu yöntemin temel prensibi, aktarılmak istenen DNA parçası kılcal pipetler (0.5-10 µm çapında) veya enjektörler yardımıyla hedef hücre içine transfer edilmesidir [37].

Sonikasyon

Bu yöntemde hücreler arası ve hücre zarında DNA parçalarının hücre içine girişini sağlayacak boşluklar açmak hedeflenmektedir bunun için ses dalgaları kullanılmaktadır. Bu yöntem ile pancar protoplastlarından başarılı sonuçlar alınmıştır [30], [34].

Lazer Mikro Işınlarıyla Transformasyon

Bu yöntemde diğer hücre zarında boşluklar açmayı amaçlayan yöntemlerle aynı yolu izlemekte ancak boşlukları açmak için UV lazer mikro ışınları (343 nm) kullanılmaktadır [30], [34].

Silikon Karbit Fiberleri ile Transformasyon

Çok başarılı olmayan bir yöntem olmakla beraber prensibi hücrelerde küçük delikler açmaya dayanmaktadır. Bu amaçla DNA silikon karbit fiberlerle kaplanmakta, fiberler hücre zarında ince delikler açmakta ve DNA'nın içeriye girmesini sağlamaktadır [30], [34].

Desikasyon

Bu yöntemin prensibi, doku desikasyonuna dayanmaktadır. Dokunun tekrar su alımı yapabilmesi için, içinde transferi amaçlanan DNA parçalarında bulunduğu ortama eklenmekte ve su ile beraber hücre bu DNA'ları da bünyesine almaktadır [30], [34].

Üreme Hücrelerine DNA Enjeksiyonu

Aktarılmak istenen DNA parçaları hedeflenen bitkinin çiçek tozlarına aktarılmaktadır [30], [34].

2.2.3 Bitkilerde Gen Ekspresyonu

Bitkilerde etkin bir gen ekspresyon tayini için aktif promotorlar gerekmektedir. Agrobecterium' dan Nopaline sentezi (*NOS*), Octapine sentezi (ocs) ve Mannopine sentezi (mas) sayesinde elde edilen promotorlar en yaygın kullanılanlarıdır. Karnabahar mozaik virüsünden (*CaMV 35S*) elde edilen *35S* RNA promotoru ise şu an gen ekspresyonunda kullanılan en popüler promotordur. Bununla beraber, tahıllarda ekspresyon için *RICE ACTIN-1* ve *MAIZE UBIQUITIN-1* promotorları da etkin kullanılanlardandır [34].

2.3 Rekombinant DNA Teknolojisinin Kullanım Alanları

Rekombinant DNA teknolojisinin kullanım alanları; endüstriyel teknolojide; gıda dışı işleme ve imalat konularını, sağlık endüstrisinde aşı ve ilaç üretimini, tarımsal gıda teknolojisinde bitki, hayvan ve gıda üretimini, tıbbi bakım teknolojisinde; insan hastalıklarının tedavisine yönelik hücre ve doku geliştirme faaliyetlerini kapsar [38].

2.3.1 Ekolojik ve Endüstriyel Uygulamaları

Endüstride kullanılan proteinler, yağlar karbonhidratlar ve yenilebilir sentetik maddeler gen teknolojisinden yararlanılarak elde edilen transgenik bitkilere ürettirilebilmektedir. Gıda sanayinden kimya sanayine kadar pek çok alanda gerek hammadde gerekse yardımcı madde olarak kullanılan bu ürünler Çizelge 2.3' de özetlenmektedir [23].

Biyoteknolojik yöntemler kirliliğin azaltılması, daha az hammadde, enerji kullanımı ve maliyetlerin azaltılması konusunda önemli avantajlar getirmektedir. Endüstriyel biyoteknoloji özellikle kimya, tekstil ve kâğıt sanayisini etkilemektedir [39].

Günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan gıda katkı maddeleri, enzimler, aromalar ve aminoasitler genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [40], [41].

Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak gıda hammaddelerinin genetik kalitesi arttırılmakla beraber gıda endüstrisinde ağır prosesler ile elde edilebilen ürünlerin üretilmesi amaçlanmaktadır. Bilim adamları portakal suyu, domates püresi veya elma sosu gibi nihai ürünleri laboratuvar koşullarında elde edebilmek için çalışmalarını sürdürmektedir [42].

Birçok bitkisel yağ, doymamış yağ asidi yüksek olan triacilgliserol içermektedir. Bu ürünler çabuk okside olmakta bu durum hem yağın tadını hem de rengini olumsuz etkilemektedir. Oleik asit miktarı yükseltilmiş olan soya tohumlarının (%24 oleik asit içerikli geleneksel soya, %85 oleik asit oranına sahip soyaya dönüştürülmüştür) oksidatif stabilitesi 10 kata kadar yükseltilmiştir. 1995 yılından beri ABD' de bu soyalar ekilmektedir [43].

Mayalanma teknolojisi, biyodegradasyon süreçleri, ayrıştırma metotları alanlarında kullanılan mikroorganizmalar genetiği değiştirilerek süreçlerin daha etkin hale gelmesi amaçlanmaktadır. Bununla beraber, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar gıda endüstrisinde ürettikleri ikinci metabolitleri sebebi ile de kullanılmaktadır [44]. Peynir üretiminde klasik yöntem olan dana midesinden elde edilen renet enziminin yerini genetiği değiştirilmiş bakterilerden üretilen kimozin enzimi almıştır [31]. Laktozsuz süt elde etmek amacıyla mikroorganizmalardan laktaz enzimi elde edilmektedir. Sütün bu enzim ile muamele edilmesi sonucunda süt şekeri laktoz, glikoz ve galaktoza parçalanarak; laktoza duyarlı olan kişiler üzerindeki olumsuz etkileri kaldırılmaktadır [45].

Çizelge 2.3 Endüstriyel amaçlarla bitkilerde gen teknolojisi kullanılarak yapılan değişiklikler [23]

Bitkiler	Kimyasal İçerik Maddesi	Kullanılan Genlerin Kaynağı	Kullanım Alanı
Tütün, yonca	α-amilaz, Fitaz, Xylanaz gibi enzimlerin ekspresyonu	*B. lichniformis* (α-amilaz), *A. niger* (Fitaz), *C. thermocellum* (Xylanaz) genleri	Gıda sanayi
Kolza	Yağ asitlerinin doymamış hale getirilmesi	Bitkiye has genlerin veya petroselinik asitin ekspresyonu için Umbelliferalardan genlerin antisens represyonu	Polimer üretimi deterjan
Kolza	Yağ asidi zincirlerinin uzatılması	*L. douglasii*'den LPAAT geninin aktarılması (erusik asit oranının artırılması)	Çözücü maddeler, yumuşatıcılar vs.
Kolza	Yağ asidi içeriğinin değiştirilmesi (Laurik asit oranının artırılması)	*U. californica*'dan bir özel Acety-ACP- Tioestraz için gen aktarımı	Temizlik maddesi
Patates	Amiloz veya amilopektin içermeyen nişasta veya sakaroz birikimi	Bitkilerin kendi enzimlerinin (GBSS, Q enzimi, ABPase) Antisens-Represyonu	Yapıştırıcı, kağıt (amilopektin), folyo (amiloz)
Patates	Fruktan	*K.pneunmoniae*'den CTG geninin aktarılması	
Thaliana, Kolza,Soya	PHB üretimi	*R. eutropha*'dan 3-Ketotiyolaz, Aseto- asetil-CoA Reduktaz, PHA-Syntaz enzimleri için gen aktarımı	Biyolojik olarak ayrışabilen polimer
Thaliana kolza	PHB/V üretimi	*E. coli* ve *R. Eutropha*'dan 4 genin (ilvA466, BktB, phbB, phbC) aktarılması	Biyolojik olarak ayrışabilen polimer

Atıkların arıtımında da genetiği değiştirilmiş organizmalardan yararlanılmaktadır [44]. Genetiği değiştirilmiş organizmaların bu amaçla kullanılması için üç strateji bulunmaktadır. Birincisi; genetiği değiştirilmiş organizmaların, ortamdaki kirletici maddeleri parçalayacak şekilde yeniden yapılandırılmasıdır. İkicisi; ortamdaki ağır metalleri kendi bünyelerinde depolayabilecek şekilde düzenlenmesi, üçüncüsü ise genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kirlenmeyi tespit amacıyla geliştirilmesidir. Bu tür uygulamalara en iyi örnek ise, Hindistan Hardalı olarak adlandırılan bir bitkidir. Bilim insanları tarafından geliştirilen bu bitki, normalinden yaklaşık dört kat kadar fazla miktarda selenyumu su vasıtasıyla köklerinden alarak depolayabilmektedir. Bir diğer çalışma ise kavağın toprakta bulunan kadminyumu emerek etkisiz hale getirmesi

amacıyla *E.coli* bakterisinden alınan ve glutasyon denen koruyucu maddenin sentezinden sorumlu genlerin kavağa aktırılmasıyla başarılmıştır [28].

Bitkilerin ağır metallere karşı toleransı sağlayıp kirlenmiş topraklarda tarım yapılabilmesine bununla beraber, yine bu toprakların iyileştirilmesine bir örnek de methalotionein genleri aktarılan tütün bitkidir. Bitki kadminyuma karşı dayanıklı hale getirilerek kirlenmiş topraklarda üretim sağlanmaktadır [23]. Petrolün deniz (tatlı su bitkileri; *Lemna minor*, *Lemna gibba* ve *Azolla filiculoides*, mikroorganizmalar; *Vibrio, Pseudomonas* ve *Bacillus*'un) ve topraktan (tarımsal bitkiler; bakla, ayçiçeği, mısır ve pamuk) temizlenmesinde genetiği değiştirilmiş bitkilerin kullanılması üzerine çalışmalar sürdürülmektedir [31].

İlave olarak, son yıllarda bilhassa organik tarımın yaygınlaşması ile daha önce petrol veya petrol türevleri kullanılarak elde edilen bazı ürünlerin yerini, bitkisel kaynaklı organik plastikler, yalıtım malzemeleri veya biyodizel gibi yakıtlar almaya başlamıştır [42].

2.3.2 Sağlık Endüstrisi Uygulamaları

Tanı, tedavi, aşı, ilaç üretimi ve gen terapi konularında kullanılmaktadır. Tıptaki moleküler yaklaşım, hastalığın belirtileriyle değil, temel nedenleriyle uğraşan bir yaklaşımdır. Hızlı ve kesin tanı testleri, yeni immünoterapi yöntemlerinin kullanılması, hastalık tetikleyici birçok çevresel koşulun keşfi ve bozuk genlerin yerine sağlamlarının konulmasını içeren gen terapisiyle çok sayıda sorun için yeni çözümler üretilmektedir [46]. Rekombinant DNA teknolojisi ile **ç**eşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar (insülin, interferon, interlökinler, çeşitli hormonlar) üretilmekte, aşılar ucuz ve güvenli şekilde elde edilerek bir çok hastalığın önüne geçilmektedir (Çizelge 2.4) [31].

Rekombinant DNA teknolojisi ile insülin ve büyüme hormonu başta olmak üzere çeşitli proteinlerden ilaç geliştirilmesinde ve üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Diyabet, hemofili, kan bozuklukları, büyüme bozuklukları ve sistik fibrosis gibi hastalıkların tedavileri biyoteknoloji ile kolaylaştırılmıştır. Geleneksel birçok önleyici ilaç, yeni gen katkılı eşdeğerleriyle tamamen yer değiştirmiş durumdadır. Örneğin, genetik olarak düzenlenmiş insan insülini diyabetli hastalar için inek ve domuzlardan doğal olarak üretilen insülinin kullanımını ortadan kaldırmıştır [46].

1980’ de fareler üzerinde başlayan tıbbi gen çalışmaları insan hastalıklarının transgenik hayvan modellerinde incelenmesi ve ürünlerinde insan proteinleri üreten çiftlik hayvanlarının üretilmesi ile gelişmiştir [31]. İlk genetiği değiştirilmiş kuzu olan Polly isimli hayvana hemofiliye neden olan kan pıhtılaştırıcı faktör-9’u kodlayan insan geni aktarılmıştır. Bu şekilde hayvanın sütünde bu proteinin bol miktarda ürettirilmesi sağlanmıştır [44]. Riboflavin (B2) vitamini etkin olan gen bir bakteriye aktarılarak daha yüksek verimde ve standart bir seviyede üretim sağlanmıştır [47]. Yapılan çalışmalar sonunda Antitrombin-III (ATIII) faktörü genetiği değiştirilmiş çiftlik hayvanlarına ürettirilmektedir. Antitrombin-III kan pıhtısı oluşumunu doğal olarak engelleyen, kandaki bir proteindir. Bu nedenle eksikliğinde pıhtılaşmayı engelleyen sistem yetersiz kalır ve pıhtı oluşumu kolaylaşır. Antitrombin-III düzeyinin düşük olması, organlara zarar verebilen anormal kan pıhtısına neden olabilir [44].

Sağlık alanında rekombinant DNA teknolojisinin bir diğer uygulaması; xenotransplantasyondur. Xenotransplantasyon, hayvanlardan insanlara organ naklidir. Normal şartlar altında diğer hayvanlardan alınan organlar insanlarla uyum sağlayamayıp vücut tarafından yabancı olarak algılanmakta ve insanın savunma mekanizması tarafından etkisiz hale getirilemememektedir. Yapılan çalışmalarla genetiği değiştirilmiş bazı organizmalarda, organın yabancı olarak algılanmasını sağlayan proteinler değiştirilerek savunma mekanizmasını etkilememesi düşünülmektedir [28].

İkincil metabolitlerin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak çok miktarda üretilmesi sağlanarak sağlık alanında maliyetlerin düşürülmesi ve ilaca kolay ulaşım amaçlanmaktadır [42]. Tükettiğimiz sıradan bitkilere aktarılacak genler vasıtasıyla patojen mikroorganizmaların çeşitli proteinlerini sentezleyen bitkiler elde edilerek bu bitkilerin aşı olarak kullanılmasına çalışılmaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı aşının oral olarak alınabilmesidir. Bu sayede ulaşımı kolaylaşmakta ve vücutta mukozal immünitenin sağlanmasına da katkıda bulunmaktadır. Böylece GDO’ lu ürünler tıbbi alanda tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Antihipertansif etkisi olan ovokinin içeren soya, laktoz intoleransı olan bireyler için üretilmiş laktoz içeriği azaltılmış süt [48], ishal aşısı içeren muz çeşitleri, kan proteini içeren patates çeşitleri, kuduz aşısı içeren ve monoklonal antikor üreten mısır çeşitleri geliştirilmiştir [42].

Çizelge 2.4 Transgenik bitkilerde ilaç etken maddelerinin üretilmesine ilişkin örnekler [23]

Ürün	Kullanım	Oranı	Aracı Bitki
İnsan Serum Albümini	Kan proteini	% 0,02 GLP1	Patates, tütün
İnsan Hemoglobini α,β	Kan Yedek Maddesi, Acil Durum İlacı	% 0,05 Tohum	Tütün
İnsan α-1 Antitripsini	Cistik fibroz, Karaciğer Hastalıkları	Bilinmiyor	Çeltik
İnsan Enkafalini	Acıların Tedavisinde Nörotransmitterler	% 0,10 tohum	Arabidopsis
İnsan Hirudini	Trombin Engellenmesi	% 0,3 tohum	Kanola
İnsan Somatotropini	Cücelik, Tuner sendromu	% 7 GLP1	Tütün
Glukoserebrosidaz	Glukoserebrosid lipidozudur	%1,0-10,00 GLP	Tütün
pEGF	Domuzda Epidermal Büyüme Faktörü (pEGF)	% 0,12 GLP	Tütün
İnsan Laktoferrini	Demir Miktarının Artırılması	% 0,10 GLP	Domates, Çeltik, Patates
Kolera Toksin B	Kolera (V. cholerae)	% 0,30 GLP	Patates
Hepatit B–yüzey antijeni	Hepatit B (Hepatit B Virüsü)	<%0,01 FG2	Tütün, Patates, Acı bakla (Agrobacterium)
Norwalk Virüsü Kapsid Proteini	Diarrhöe (Norwalk Virüsü)	% 0,37 GLP % 0,23 GLP	Patates Tütün (Agrobacterium)
Glikoprotein	Kuduz (Rabies Virüsü)	% 1,00 GLP	Domates, tütün, ıspanak (TMV, AIMV)
Glikoprotein B	Zitomegalie Hastalığı	<% 0,02 GLP	Tütün (Agrobacterium)
VP 1 FMDV	Deli Dana Hastalığı (FMD Virüsü)	Bilinmiyor	Yonca, Arabidopsis (Agrobacterium)
Glikoprotein S	Domuz Yavrusunda Diarrhöe	<%0,01 FG % 0,20 GLP	Mısır (Agrobacterium), Tütün
VP 60 HDV	Tavşanlarda Hemarrhagik Ateş (HDV)	% 0,30 GLP	Patates (Agrobacterium)
Guyın 13 MAK'sı, Sekrete Edilmiş	Diş Çürüklüğü (Streptococcus Mutans)	500 µg/g FG Yaprakta	Tütün (Agrobacterium)
Kimerik Antibodyler	Kanser tedavisi (Karzinoembriyogenik Antigen)	Bilinmiyor	Çeltik
İnsan scFV' si	Kanser tedavisi (Karzinoembriyogenik Antigen)	30 µg/g FG	Çeltik, buğday
1GLP = Toplam çözünebilir protein; 2FG = Taze ağırlık			

2.3.3 Tarım ve Hayvancılık Alanında Uygulamaları

Rekombinant DNA teknolojisi tarım ve hayvancılıkta da geniş kullanım alanı bulmuştur. İlk ürünler, hayvanların tedavisinde kullanılmak üzere ya da tarım zararlılarıyla biyolojik mücadelenin sağlanması amacına dönük olarak piyasaya sürülmüştür [49].

2.3.3.1 Hayvancılık Alanında Kullanılması

Hayvancılık alanında kullanılarak hayvanlara gen transferinden; hayvanların büyüme parametrelerinin iyileştirilmesi, üreme oranının artırılması, süt üretimi, besin değerinin artırılması ve kompozisyonunun değiştirilmesi (laktozsuz süt, aminoasit yapıları değiştirilmiş proteinler vb.), hayvanların yemden yararlanma kabiliyetlerinin artırılması, transgenik hayvanların organ vericisi haline getirilmesi amaçlanmaktadır [45].

Hayvansal üretim ile ilgili biyoteknolojik çalışmalarda; çeşitli hayvan türlerinden büyüme hormonu genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu üzerine yoğunlaşılmıştır [46]. Et ve sütünden yararlanılan koyun, inek ve boğaların genetik yapılarındaki değişiklikler, bu hayvanlardan elde edilen et ve süt oranının artışına olanak sağlamaktadır [28]. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak büyüme hormonları üreten bakterilerden elde edilen rekombinant büyüme hormonları memeli hayvanların metabolizmasını değiştirmede kullanılmaktadır. Laboratuvar şartlarında elde edilen büyüme hormonu ineklere (12-50 mg) buzağılamadan 10-12 hafta sonra 3-6 ay süreyle verildiğinde süt verimlerinde %22-41 arasında bir artış olduğu ve yemden yararlanmanın %12-14 oranında arttığı gözlenmiştir [45].

Balıkçılık sektöründe; büyüme hızının artırılması, büyüme hormonu sentezleyen genetik yapının aktarılması ile sağlanmıştır ve genetik yapısı değiştirilmiş alabalık çeşitleri ticareti yapılan balık türlerindendir. Balıkçılıkta modern biyoteknoloji, aşılar ve teşhis kitlerini de kapsamaktadır [46]. Bununla beraber, genetiği değiştirilmiş balık üretimi ile denizdeki diğer canlı popülasyonundan etkilenmeksizin yüksek kalite ve miktarda balık üretimi gerçekleştirilmektedir [28].

Balıkların beslenmesinde de rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılmaktadır. Bu amaçla balık yemlerinin protein kaynağı olan balık unu üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Balık ununun pahalı olması, stabilite sorunu, içeriğinde bulunan fosfor miktarının su ortamında ötrofikasyona yol açması gibi dezavantajları vardır. Bu dezavantajları gidermek için balık unu yerine yem için bitkisel bir protein araştırılmakta bu amaçla buğday, kanola ve yağından yararlanılmaktadır. Bitkisel protein içindeki fosforun ve bitki içinde balığa zararlı olabilecek bileşenlerin giderilmesi amacı ile rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılmaktadır [38].

2.3.3.2 Bitkisel Üretim Alanında Kullanılması

Tarımda 1980' li yıllarda başlanan transgenik bitki kullanımı bitki biyolojisi ve tarımsal ilerlemelere konusunda yeni ve ilginç açılımlara yol açmıştır. 2001 yılında 4500' den fazla bitkinin genetiği değiştirilerek pilot uygulamalarla üretildiği, 40' dan fazla ürününde ticari olarak üretildiği bildirilmektedir [50].

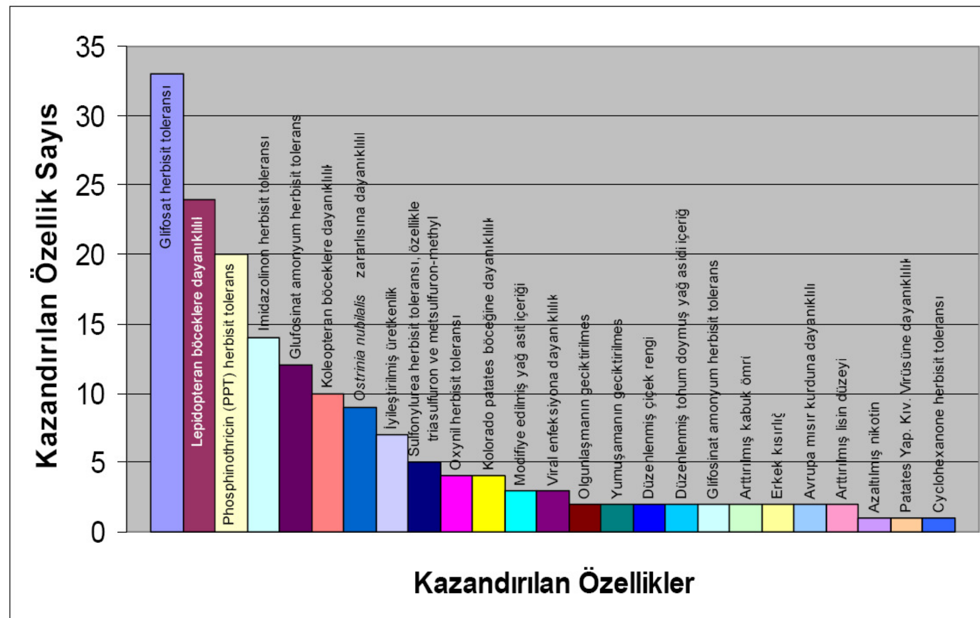
GDO' lu ürünler oluşturulurken özellik aktarımı ürün çeşidine göre belirlenmiştir. Çalışma yapılırken bazen aynı bitkiye birden fazla transgenik özellik kazandırılmaktadır. Çizelge 2.5 ve Çizelge 2.6' da kazandırılan özellikler ayrıntılı olarak gösterilmektedir [24]. En çok üzerinde çalışılan özellikler, hastalıklara ve zararlılara dayanıklılık, yabancı ot ilaçlarına dayanıklılık, meyve olgunlaşma sürecinin değiştirilmesi, raf ve depolama ömrünün uzatılması ve aromanın artırılmasıdır. Gen transferinde en başarılı olunan bitkiler; domates, patates, mısır, soya fasulyesi, pamuk, tütün ve kolzadır [51].

Rekombinant DNA teknolojisinin tarımsal kullanımında kronolojik olarak ilk uygulamalar; zararlılara, yabancı ot ilaçlarına ve viral bitki hastalıkları ile bunlardan herhangi ikisine dayanıklılık kazandırma yönünde olmuştur [49]. Böceklere karşı dayanıklı transgenik bitki üretimi biyoteknolojik gelişmelerin önemli bir parçasıdır (Çizelge 2.7). Bu kapsamda *Bacillus thuringinensis* (Bt) sporları bu amaçla kullanılmaktadır. Bt'nin böcek öldürücü etkisi, içinde bulunan kristal proteinlerden kaynaklanmaktadır. Bu proteinleri kodlayan genler bitkilere aktarılmış ve bitkinin bu proteinleri üretmesi ile patojenlere dayanıklı bitkiler üretilebilmiştir [50]. Bununla beraber, bazı bitkiler proteaz inhibitörleri, lektinler, kolesterol oksidaz, lipoksigenaz gibi maddeleri üretmektedir, bu grup proteinler böcekler üzerinde toksik etki yapmaktadır. Bu proteinleri üreten genlerin tarımsal değeri olan bitkilere aktarılmasıyla bitki böceklere dayanıklı hale getirilmektedir [52].

Çizelge 2.5 GDO’ lu ürünlere aktarılan özellikler-1 [24]

Kazandırılan Özellik
Glifosat herbisit toleransı
Lepidopteran böceklere dayanıklılık
Phosphinothricin (PPT) herbisit toleransı, özellikle glufosinat amonyum
Imidazolinon herbisit toleransı
Glufosinat amonyum herbisit tolerans
Koleopteran böceklere dayanıklılık
Ostrinia nubilalis zararlısına dayanıklılık
İyileştirilmiş üretkenlik
Sulfonylurea herbisit toleransı, özellikle triasulfuron ve metsulfuron-methyl
Oxynil herbisit toleransı
Kolorado patates böceğine dayanıklılık
Modifiye edilmiş yağ asit içeriği
Viral enfeksiyona dayanıklılık
Olgunlaşmanın geciktirilmesi
Yumuşamanın geciktirilmesi
Düzenlenmiş çiçek rengi
Düzenlenmiş tohum doymuş yağ asidi içeriği
Glifosinat amonyum herbisit tolerans
Arttırılmış kabuk ömrü
Arttırılmış lisin düzeyi
Avrupa mısır kurduna dayanıklılık
Azaltılmış nikotin
Patates yaprak kıvırcıklık virüsü (PLRV) ne dayanıklılık
Cyclohexanone herbisit toleransı, özellikle sethoxydim

Çizelge 2.6 GDO’ lu ürünlere aktarılan özellikler-2 [24]



Tarımsal üretimde virüslerin kimyasal yöntemlerle önlenmeye çalışılması oldukça zordur. Bununla beraber, klasik ıslah yöntemleri ile oluşturulan virüslere dayanıklı bitkilerin de virüsün zamanla genomik yapısını değiştirmesi sebebi ile etkisiz hale geldikleri bilinmektedir. Bu sebeple virüslere dayanıklı transgenik bitkiler üretilmekte (Çizelge 2.7) ve bu alanda başarı sağlanmaktadır. Bu amaçla 40'dan fazla familyaya ait değişik bitki türleri virüslere dayanıklı hale getirilmiş, tarımsal üretimde de yerini almıştır. Örneğin; Hawai' de yetiştirilen papayaların %60' ı virüslere dayanıklı formdadır [52].

Tarımsal üretimde verimi düşüren faktörlerden biri yabancı otlardır. Kültür bitkilerinin suyunu ve besin maddesini kullanan yabancı otlar hastalık ve zararlılara aracılık ederek tarımsal üretimin düşmesine neden olurlar. Afrika' da toplam tahıl hasat alanlarının %40' ında ayrık problem olmakla beraber tohum sayılarının çok fazla olması nedeni ile kimyasal mücadele olmadan yayılmanın önlenemeyeceği bildirilmektedir [42]. Bütün bu sebepler neticesinde herbisitler tarımsal üretimde önemli bir yer edinmektedir. Gelişmiş ülkelerde herbisitler, tarımsal kullanıma yönelik satılan pestisitlerin %60-70' ini oluşturmaktadır [52].

Çizelge 2.7 Zararlılara ve hastalıklara dayanıklı transgenik bitkiler [23]

GDO' lu Bitki	Özellik	Gen teknolojik Değişiklik
Mısır	Mısır kurdu	CrylA (b) geninin *Bacillus thuringiensis* 'den aktarılması, PEPC promotoru
Pamuk Domates	Pamuk kurdu, pembe kurt, yeşil kurt ve domates meyve kurdu	CrylA (b) geninin *Bacillus thuringiensis* 'den aktarılması
Patates	Patates Böceği	
Şekerpancarı Buğday Çeltik	Rhizomania virüsü, nekrotik sarı damar hastalığı (BNYV virüsü) Sarı cücelik virüsü (BYD virüsü), Çeltik şerit virüsü, cücelik virüsü, FMV	Virüsün belli kabuk veya taşıyıcı proteinini kodlayan genlerin aktarılması
Patates	Mildiyö	Aspergillus niger'den Glikoz-Oksidaz genin aktarılması, *35S* promötörü
Buğday	Fusarium spp., Septoria	Bilinmiyor
Çeltik	Rhizoctonia solani	Chitinaz geni Chi11'in aktarılması
Patates	Yumuşak çürüklük	Pektatlyaz genlerinin aktarılması
Çeltik	Çeltikte bakteriyel leke	Xa21 geninin aktarılması

Kimyasal mücadeleye alternatif olarak herbisitlere dayanıklı tarımsal bitkiler üretilmektedir (Çizelge 2.8). Bu amaçla aktif maddesi bromoxilin, sülfonilurea, imidazolinon ve glifosfat gibi maddeler olan total herbisitlere karşı dayanıklı şekerpancarı, mısır, pamuk, buğday, yonca, şeker kamışı, kolza, soya fasulyesi, sebze, meyve ve orman ağaçları geliştirilmiştir [42].

Bazı canlılar zorlu çevre koşulları ile karşılaşınca hayatta kalabilmek için çeşitli organik maddelerin biriktirilmesi yoluyla metabolizmalarını düzenlerler. Bu bitkilerin strese karşı dayanıklılık özellikleri ticari bitkilere de kazandırılarak üretim alanlarının genişlemesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, tuza ve soğuğa dayanıklı patates ve tütün bitkisi üretilmektedir [50]. Stres faktörlerine (kuraklık, tuzlanma, ağır metaller, çevre kirliliği vs.) dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde genellikle bu stres faktörlerini bertaraf edecek enzimleri ifade eden genler kullanılmaktadır. Arpada bulunan ve su kaybına karşı dirençlilik kazandıran *HVA1* genini pirince başarılı bir şekilde aktarılmıştır. *Escherichia Coli*' de bulunan ve kuraklığa karşı direnç sağlayan *TREHALOSE* geni pirinç bitkisine aktarılmıştır [28].

Bilim adamları, biyoteknolojik gelişmeleri kullanarak ticari kalitesi arttırılmış, gıda proseslerini azaltan, tüketici istek ve ihtiyaçlarına en iyi cevabı verebilecek ürün geliştirmeye çabalamakta, bitkilerde bulunmayan veya az bulunan maddelerin ürettirilmesi ve zenginleştirilmesi amaçlamaktadırlar [23]. Bu amaç doğrultusunda geliştirilen ürünler Çizelge 2.9' da da görüldüğü gibi; protein ve yağ oranı değiştirilmiş soya fasulyesi çeşitleri, likopen oranı artırılmış domates çeşitleri, aminoasit oranı artırılmış tahıl çeşitleri, yem ve gıda değerini artıran lisin oranı artırılmış, fitat oranı azaltılmış mısır çeşitleri, şeker oranı artırılmış mısır ve çilek çeşitleri, renkli ve farklı kalitede life sahip pamuk çeşitleri, beta ve karoten oranı artırılmış kolza çeşitleri, doymuş yağ asidi oranı azaltılmış, doymamış yağ asidi oranı artırılmış soya ve kolza çeşitleri, demir ve vitamini artırılmış çeltik çeşitleri, düşük kalorili şeker oranına sahip şeker pancarı çeşitleri, kuru madde oranı yüksek domates ve patates çeşitleri, gluteni ve ekmeklik kalitesi yükseltilmiş buğday çeşitleri, yüksek nişasta oranına sahip patates çeşitleri, kafein oranı azaltılmış kahve çeşitleri geliştirilmiştir [42], [53].

Çizelge 2.8 Herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler [23]

GDO' lu Bitki	Herbisit	Dayanıklılığın Etki Mekanizması
Tütün, mısır, pamuk, kolza, soya, şekerpancarı, domates	Glifosfat	EPSPS enzimi için *35S*-promotoru tarafından yönlendirilen genin ve Oksidoredüktaz için bir bakteriyel genin aktarılması herbisitin neden olduğu yoğun EPSPS üretimi ve aynı zamanda Oksidoredüktaz ile herbisitin detoksifikasyonuna dayanıklılık ortaya çıkmaktadır.
Patates, tütün, mısır, yonca, kavun, kenevir, kavak, çeltik, soya, şekerpancarı, domates, kolza, buğday	Fosfonitrisin	Bar geninin *S. hygroscopicus*'den transfer edilmesiyle herbisitin asetilasyon ile detoksifikasyonu sağlanmaktadır.
Patates, tütün, pamuk, domates	Bromoxynil	*Klebsiella ozaenae'den* bxn geninin aktarılması herbisitin detoksifikasyonunu sağlamaktadır
Patates, tütün, pamuk	2,4.D	*Alcaligenes eutrophus*'den 2,4.D-Monooksigenaz geninin transferi herbisitin detoksifikasyonunu sağlamaktadır
Tütün	Atrazin	Dayanıklı bir yabani formdan psb-A geninin veya bir Gltathion-S- Transferaz geninin aktarılması herbisitin daha az etkili olmasını veya detoksifikasyonunu sağlamaktadır
Patates, tütün, pamuk, kenevir, kivi, mısır, soya, şekerpancarı, domates	Sülfonil Üre Maddeleri	*N. tabacum* veya *A. thaliana*'dan değiştirilmiş ALS genlerinin aktarılması herbisitin hedef enzimin olan ALS' ye olan afinitesini azaltmaktadır

Tarımsal üretimde verimin arttırılmasında solunum, fotosentez ve azot fiksasyonu önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmalardaki verimi arttırmak amacıyla bakterilerden nodülasyon faktörleri kültür bitkilerine aktarılmaktadır. Örneğin, *Chlorella sorokiniana* alglerinden bitkilere aktarılan bir gen azot değerlendirme oranını yükseltmiştir [23]

Çizelge 2.9 Bitkilerde gen transferi ile ürün kalitesinde meydana getirilen değişiklikler [23]

Bitki	Kimyasal İçerik Maddesi	Kullanılan Genlerin Kaynağı
Kolza, soya fasulyesi, mısır	Lisin, Methionin, Triptophan gibi aminoasitlerin miktarının artırılması	Lisin ve Triptofanın üretimini artıran bakteriyel kökenli genler
Patates, Cassava	Toplam protein miktarının artırılması	Alerjik etkiye sahip olmayan bir Albümin geninin aktarılması, tohumlardaki ekspresyonu
Kolza	Yağ asidi zincirlerinin kısaltılması, Laurin asit oranının artırılması	*Umbellularia californica*'dan *Asetil ACP-Tioesteraz* spesifik genin aktarılması
Soya fasulyesi, kolza, ayçiçeği	Yağ asidi içeriğinin değiştirilmesi, doymamış yağ asitlerinin artırılması	FAD 3 ve FAD 2 geninin klonlanması.
Patates	Amilaz veya amilopektin içermeyen nişasta veya sakaroz birikimi	Bitkilere özel enzimlerin (örn. GBSS, Q enzimi, AGPaz) kazandırılması
Patates	Siklodekstrin ekspresyonu	*Klebsiella pneunmoniae*' den CTG geninin aktarılması
Patates	Nişasta oranın artırılması	Mutasyona uğrayan *AGPaz* geninin E.coli'den aktarılması
Çeltik	ß-karotenin üretilmesi	Narcissuus türleri veya *E.uredovora*' dan Terpenoid metabolizmasının anahtar enzimlerini kodlayan genlerin aktarılması
Çeltik	Demir içeriğinin artırılması ve kullanılabilirliğinin azaltılması	Phaseolus vulgaris'ten bir demir geninin aktarılması, *A. fumigatus'* tan bir *PHYTASE* geninin aktarılması
Domates	Lycopin ve Lutein gibi karotinoidlerin oranının artırılması	Phytoenin, lycopine dönüştürülmesi için bir bakteriyel genin aktarılması

Ürünlerin hasat sonrasında taşınması ve depolanması sırasında meydana gelen kayıpları önlemek amacıyla rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılmaktadır. Zira bu kayıplar ABD ve Avrupa ülkelerinde %40, diğer ülkelerde %80' leri bulmaktadır. Taze meyve ve sebzelerin fiziksel, duyusal ve içeriğinde meydana gelen kayıplar çoğunlukla enzimatik reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu amaçla 1994 yılında ABD'de geliştirilen domateste olgunlaşmayı sağlayan poligalakturonaz enzim aktivitesi ve etilen sentezi bloke edilerek raf ömrü uzatılmıştır [50]. Flavrsavr domatesler olarak adlandırılan raf ömrü uzatılmış bu domateslerde antisense teknolojisinden yararlanılmıştır. Bu teknoloji normal mRNA ile antisense RNA' nın eşleşmesi sağlanarak protein oluşumunun engellenmesi prensibine dayanmaktadır [33]. Raf ömrünün uzatılması diğer bazı bitkilerde de gerçekleştirilmiştir. Örneğin; raf ömrü uzatılmış

karanfil diğer karanfil türevlerine göre 2 katı süre özelliklerini kaybetmeden kalmaktadır [28].

Bitkilerin ürettiği bazı maddeler, insanlarda toksik veya alerjik etki gösterebilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla bu maddelerin etkisinin azaltılması amaçlanmaktadır. Örneğin; fitin asit bileşiklerinin (fitat) bitkiye fitaz enzimi ilavesi ile oranı azaltılmıştır. Fitat tahıllar ve sebzelerde bazı minerallerin alımını engellemektedir. Ayrıca patates ve domateste bulunan glikoalkaloid toksik bileşiklerinin üretimi durdurulmuştur. Soya, yer fıstığı ve cevizde bulunan gluten-28 proteinin üretimi azaltılarak alerjik etkisi düşürülmüştür. [23], [54].

Genetiği değiştirilmiş bitkilerin en renkli uygulama alanlarından birisi de doğada normal olarak bulunmayan çiçek renklerinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu şekilde gül, orkide ve karanfil gibi birçok bitkinin çiçek rengi değiştirilerek ticari olarak piyasada yerini almışlardır [28].

2.4 GDO' lu Bitki Üretiminin Avantajları

2.4.1 Çevre Üzerine Avantajları

Genetik yapısı değiştirilmiş organizmaların çevre açısından en önemli faydası daha az kimyasal madde kullanımına yol açmalarıdır. Kimyasalların aşırı kullanılması hem toprak hem de su kirliliğine yol açmaktadır. Artan kirlilik ise toprak ve suda bulunan biyolojik çeşitliliği önemli ölçüde tehdit etmektedir. GDO' lu bitkiler özellikle bazı hastalıklar, böceklere ve herbisitlere karşı dirençli olmasından dolayı daha az kimyasal madde kullanımına imkân sağlamaktadır [55]. Böylece besin zincirinde daha az kimyasal madde kalıntısına sebep olunmaktadır [28].

GDO' ların çevre açısından diğer bir avantajı ise zararlı kimyasalların ve ağır metallerin topraktan veya sudan uzaklaştırılmasını sağlamalarıdır. Bu sayede hem bitkileri hem de toprağı olumsuz etkileyen bileşenler kolaylıkla yok edilebilmektedir [56].

Artan nüfusla beraber tarımsal alanlara ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Bu durum orman alanlarının tarımsal amaçlarla kullanılmasını sonuç olarak da tahrip edilmesine neden olmaktadır [57]. GDO' lu ürünler sayesinde daha az toprak işlemeye ihtiyaç duyulmaktadır. Yüz ölçümü daha dar alanlarda daha fazla ürün elde edilebilmekte

böylece ormanların tarla yapılması ihtimali ortadan kalkmaktadır. Bununla beraber, toprak kaybı ve erozyondaki azalmalardan da bahsedilebilmektedir [47].

GDO' ların diğer bir uygulama alanı olan plastik üretimi de çevre açısından oldukça büyük yararlar sağlamaktadır. Transgenik bitkiler kullanılarak parçalanabilir plastik hammaddesi üretilebilmektedir. Polihidroksibütrat (PHB) bir çeşit parçalanabilir plastik hammaddesidir ve *Alcaligenes eutrophus* adlı bakteri tarafından üretilmektedir. Bilim insanları bu maddenin sentezinden sorumlu olan genleri bakteriden alarak yonca bitkisine başarıyla aktarmış ve parçalanabilir plastiğin sentezini gözlemlemişlerdir. Bu yolla gelecekte çevre kirliliğinde önemli bir yer tutan sentetik plastik kullanımının yerini bu doğal malzemenin alması ile çevre üzerinde önemli bir etki yaratacağı düşülmektedir [28].

Rekombinant DNA teknolojisi ile kağıt üretiminde kullanılan ağaçlarla ilgili çalışmalar yürütülmektedir. Genetiği değiştirilmiş ağaçlar %50 daha az lignin -lignin kağıt üretimi sırasında kimyasal olarak selülozdan ayrılması gereken odun türevi bileşenlerdir- ve %15 daha fazla selüloz içermektedir. Bu sayede, GDO' lu ağaçlardan elde edilen kağıt verimi doğal olanlara oranla arttırılmıştır. Bununla beraber, GDO' lu ağaçlar diğer türlerine göre %25-30 daha uzundur. Bu da kağıt üretiminde alan, kimyasal ve enerji kullanımını azaltmakta, verimi arttırmakta aynı zamanda kağıt üretiminin çevreye olan olumsuz etkisini minimize etmektedir [57].

2.4.2 İnsan Sağlığı Üzerine Avantajları

GDO' lu ürünlerin insan sağlığı üzerine en büyük katkısı ürünlerin besin içeriğinin zenginleştirilmesi yolu ile halk sağlığı problemlerinin çözümünü sağlamasıdır. Bilindiği üzere özellikle üçüncü dünya ülkelerine olmak üzere açlık ve malnütrisyon en önemli halk sağlığı problemlerinin sebeplerindendir [48]. Besin miktarının arttırılması ve içeriğinin zenginleştirilmesinin temel amacı insan sağlığı açısından önemli olan maddelerin yeterli seviyede üretilebilmesidir. Bu şekilde, gıda maddelerinde daha önceden var olmayan veya az miktarlarda üretilen çeşitli maddelerin üretimi arttırılmakta veya yeni maddelerin üretilmesi sağlanmaktadır [28]. Örneğin; A vitamini içeriği zengin pirinç (Golden Rice) bu amaçla üretilen ürünlerdendir. Dünyada okul öncesi dönemde bulunan 3 milyon çocuğun A vitamini eksikliğinden kaynaklanan

görme bozukluğu olduğu, her yıl bunlardan 250.000-500.000 kadarının kör olduğu bunlarında 2/3 ‘ünün izleyen birkaç ay içerisinde öldüğü tespit edilmiştir. Bu ürün sayesinde özellikle pirincin temel tüketim maddesi olduğu bölgelerde A vitamini eksikliği probleminin çözümü amaçlanmaktadır [40]. Bitkilerdeki mineral ve vitamin artışlarına diğer bir örnek de *Arabidopsis thaliana* adı verilen model bitkideki C vitamini miktarının çilekten alınan bir genin aktarılması ile arttırılmasıdır. Ayrıca 1998 yılında bilim insanları Arabidopsis bitkisini kullanarak E vitamini sentezinden sorumlu genleri daha çok çalıştırmak suretiyle normale göre daha yüksek miktarda E vitamini üremini başarmışlardır [28].

Daha fazla büyüme hormonu salgılayan, et üretiminin arttırıldığı balıklar besin miktarının arttırılmasına yönelik örneklerdir [48].

Toplum içinde besin alerjisi artış göstermektedir. Yetişkin popülasyonunun %1-2’si, çocukların da yaklaşık olarak %2-8’ inde gıda alerjisi gözlenmektedir. Besin alerjisinden yer fıstığı, inek sütü, buğday, yumurta, kabuklu deniz canlıları, balık, fındık ve soya sorumludur. Rekombinant teknoloji ile besinler içerisindeki alerjik proteinlerin uzaklaştırılması veya yapısının değiştirilerek alerjenite özelliğinin azaltılması amaçlanmaktadır [58].

Sağlık sektöründe biyoteknolojinin kullanımı sadece hastalık ve hastaları kapsamamakta bireylerin kişisel genetik yapıları öğrenilerek daha uzun ve kaliteli bir yaşamı hedeflemeleri sağlanabilmektedir. Moleküler tanı, preimplantasyon, genetik tanı, kök hücre çalışmaları sayesinde embriyonik dönemden itibaren yaşam dönemlerinin tümü için önleyici, tanısal ve tedavi edici yöntem ve ürünler geliştirilmektedir [59].

Rekombinant DNA teknolojisi ile **ç**eşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar (insülin, interferon, interlökinler, çeşitli hormonlar) üretilmektedir. [31], [60].

Kalıtsal bozukluklar, AIDS, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozuklukların tedavisinde gen terapisi üzerine çalışmalar sürmektedir ve gelecekte önemli bir tedavi seçeneği haline geleceği öngörülmektedir [61].

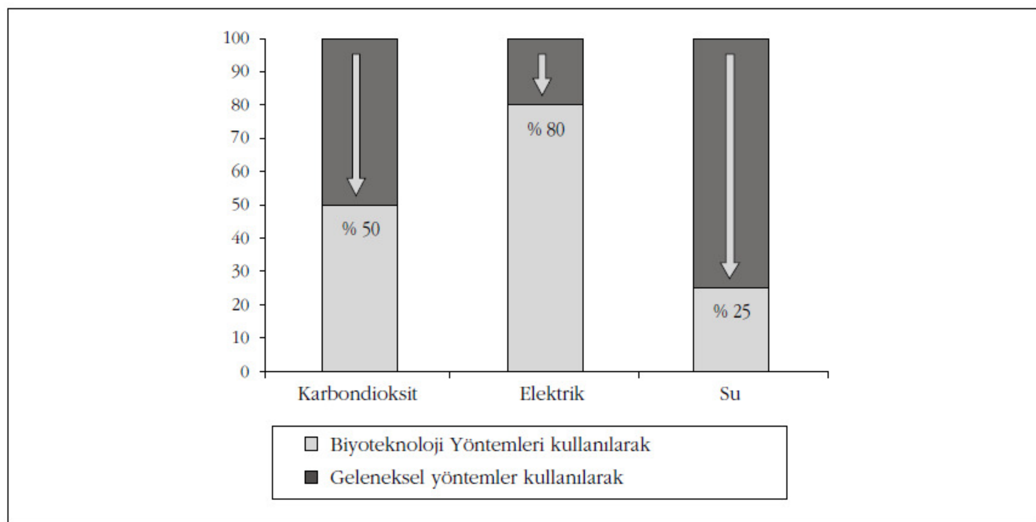
Dünya üzerinde pek çok insan aşılama yöntemi ile önlenebilir hastalıklar sebebi ile hayatını kaybetmekte veya sakat kalmaktadır. Aşıların pahalı olması, uygulamada

eğitimli personele ihtiyaç duyulması, taşınması ve saklanmasındaki güçlükler, insanların sosyokültürel yapısı gibi sebeplerle birçok insan aşıya ulaşamamaktadır. Bilim insanları da tükettiğimiz sıradan gıdaların aşı fonksiyonu yürütmesi üzerine çalışmalarını sürdürmektedir. Oral olarak tüketilebilecek bu besin-aşılar ile aşıya ulaşımın kolaylaşacağı, vücutta mukozal immünitenin sağlanmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir. Bu amaçla patates, muz, tütün ve marul gibi erişimi kolay ürünlerde çalışmalar sürdürülmektedir [48].

Transgenik bitkilerden elde edilen aşılar, patojenlerin ve toksinlerin bulaşma riskinin azaltılmasına yardımcı olarak hayvansal sistemlere göre daha az tehlike içermektedir. Bununla beraber, aşıların eldesinde uygulanan izolasyon, temizleme gibi prosesleri ortadan kaldırması ile aşı maliyetleri önemli ölçüde azaltılmaktadır [23].

2.4.3 Sosyo-Ekonomik Yapı Üzerine Avantajları

Biyoteknolojinin ekonomik yararları yeni iş alanları yaratılması ve üretim maliyetlerinin azalması (enerji ve hammadde kullanımından tasarruf edilmesi) olarak sıralanabilir. Ayrıca biyoteknolojik üretim yöntemleriyle daha az karbondioksit yayılımı, daha az elektrik kullanımı ve çok daha az su kullanımı söz konusudur (Şekil 2.5). Böylece biyoteknolojik üretim yöntemleriyle maliyeti daha düşük ve çevre dostu üretim yapmak mümkündür [59].



Şekil 2.5 Geleneksel yöntemler yerine biyoteknoloji yöntemlerinin kullanımına bir örnek olarak biyoteknolojinin antibiyotik üretimindeki süreçlerde kullanımının getirilmesi [59]

GDO’ lu ürünlerin hastalık ve zararlılara dayanıklı olması ile çiftçi daha az kimyasal ilaç kullanmakta bu da ilaçlama maliyetlerini düşürmektedir. Bununla beraber, bitki daha az strese girdiği için verimi artmaktadır. Yabancı otlara karşı dayanıklı olan ürünlerde ise, yapılan ilaçlama sadece yabancı otları etkilemekte tarımsal ürüne zarar gelmemekte bu da ekonomik açıdan üreticiyi etkilemektedir [31].

Biyoteknolojik yöntemlerin tersine olarak klasik yöntemlerden yararlanılarak yeni tür geliştirme çalışmaları yıllar alabilmektedir. Bu da araştırma geliştirme çalışmalarını olumsuz etkilemektedir. Bununla beraber, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak bitki cins ve türleri arasında veya cins ve tür içinde bitkiler arasında genetik ve stoplazmik uyumsuzluklar yaşanmadan başarılı melezleme işlemleri gerçekleştirilebilmektedir [48].

2.5 GDO’ lu Ürünlerin Riskleri

2.5.1 İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Riskleri

GDO’ lu ürünlerin kullanımı ile mevcut hastalıklarla mücadeleyi zorlaşabileceği, yeni hastalıkların ortaya çıkabileceği, alerjik, kanserojen ve toksik etkilerin artabileceği belirtilmektedir [46].

Antibiyotik Direnci

Uygulanmakta olan rekombinant DNA teknolojisi ile bitkisel ürünlere aktarılan genler bitki, bakteri ve virüs kaynaklıdır. Gen aktarımı veya değişikliğe uğratılma sırasında işaretleyici olarak antibiyotiğe duyarlılık genleri kullanılmaktadır [62]. Antibiyotik dirençli işaretleyici genlerin yatay gen transferi yoluyla bağırsak bakterilerine ve patojenlere yayılması, konak gen veya genomlarla etkileşim aracılığıyla oluşan transgenik ürünlerin toksik ya da alerjik etkilerinin olabilmesi, yatay gen transferi ve rekombinasyonun yeni patojen bakteriler ve virüsler yaratma potansiyeli, transgenik DNA’ nın transgenik besinlerin tüketiminden sonra hücrelere bulaşma, hastalık virüslerini yenileme ve hücre genomuna yerleşme tehlikesi endişe duyulan konulardır [46], [63].

İnsan sindirim sistemi ortamının gen geçişlerine uygun bir ortam olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir çünkü insan salyası ve mide asidi karıştığında DNA

parçalanması 30 saniye içinde başlamaktadır. New Castle Üniversitesi araştırmacılarının yürüttüğü bir araştırmada, GDO’ lu soya yiyeceği, sindirim sistemi sağlıklı olan 12 kişi ve bağırsak ameliyatı geçiren 7 hastaya besin olarak verilmiş, elde edilen sonuçlara göre, sağlıklı bireylerde yenilen DNA sindirim sistemi ve bağırsak bakterilerinde kalmadan dışarı atılmıştır Ameliyat geçiren hastalarda ise yenilen DNA'nın %4' ü bağırsaklarda bulunmuş, bir kısmı da bağırsak bakterilerine geçmiştir. Bu çalışmada kullanılan DNA herbisit direnç geni içermektedir. Çalışma, GDO DNA'sının yatay geçiş yapabileceğini göstermek açısından önemlidir [28].

Avrupa konseyinin 1999 yılında hazırlatmış olduğu bir raporda bu endişenin bilimsel nedenlerle açıklanamayacağı bildirilmiş olup, bundan sonra geliştirilecek transgenik ürünlerde bu genlerin kullanılmaması tavsiye edilmiştir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) GDO paneli, 2 Nisan 2004 tarihinde yayınlamış olduğu Bilim Paneli Görüş Dokümanı’ nda antibiyotiğe direnç genlerini 3 grupta toplamış ve halen üretilip tüketilmesine izin verilen transgenik ürünlerde bulunan *NPT-II* işaret geninin insan ve çevre sağlığına olumsuzluklarının olmadığını, klinik tedavide kullanılan antibiyotiğe direnç genlerinin ise transgenik ürünlerde kullanılmaması gerektiği vurgulanmıştır [47].

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization;WHO), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food Administration Organization; FAO) ve Avrupa Gıda Güvenliği Birliği (The European Food Safety Authority; EFSA)’nin düzenlediği bir toplantıda antibiyotik direnci riski tartışılmış, toplantı sonunda bu riskin düşük de olsa ortaya çıkabileceği bildirilmiştir. Bu sebeple, bilim insanlarından antibiyotik direnci geni yerine farklı teknikler kullanılması istenmiştir [31].

Alerjenite

Gen aktarım teknolojisi ile organizmaya yerleştirilen yeni genin özellikleri, insanlar için alerjik reaksiyonlara neden olabileceği veya mevcut alerjik reaksiyonları şiddetlendirebileceği düşünülmektedir. Örneğin, Brezilya Kestanesi' nden gen transferiyle methionin içeriği daha yüksek soya fasulyesi üretiminin amaçlandığı bir çalışmada; Brezilya Kestanesi' nden soya fasulyesine alerjenite geçmiştir. Eğer proje devam etseydi soya fasulyesi sadece soyaya alerjik insanları değil Brezilya Kestanesi’ ne alerjik insanları da etkileyeceği tespit edilmiştir [53].

Teknoloji koruma sistemlerindeki (terminatör sistem) mekanizma; bir promotorun etkisi sonucu toksinler aracılığı ile tohumlar steril hale getirilmesi şeklindedir. Bu sistemde kullanılan RIP toksininin hayvanlarda direk zehir etkisi yapmayıp bağırsaklarda parçalanıp inaktif hale geçtiği bildirilmiş olup bunun zamanla alerjik reaksiyonlara yol açabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber, yine terminatör sistemde kullanılan barnaz enziminin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisinin olabileceği sanılmaktadır [42].

Organların Fonksiyonları Üzerine

İngiltere‘ de yapılan bir çalışmada GDO‘ lu ürünlerden elde edilen bazı enzimlerin sıçanların böbreklerinde hücre ölümlerine neden olduğu saptanmış olup bu ürünlerin canlının bağışıklık sistemini zayıflattığı belirlenmiştir [42].

Kanser

Transgenik bitkilerin doğrudan ve dolaylı olarak kanserojen etkisinin olabileceği birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Özellikle, herbisitlere dayanıklı transgenik pamuk, soya, mısır ve kolza çeşitlerinde kullanılan ‘bromoxynil’ ve ‘glufonsinate’ gibi kimyasal maddelerin doğrudan kanser yapıcı oldukları bilinmektedir [46].

BGH hormonu, süt pastörizasyonu sırasında parçalanmamakta ve insanda aktif hale geçerek hücre bölünmesine yol açabilmektedir. Araştırmacılar bu sebeple kanserli doku gelişmesine neden olma olasılığını araştırmaktadırlar. Yapılan bir çalışmada hormonun midede büyük ölçüde yıkılmadığı, bağırsaklardan kana geçti tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada BGH hormonunun kullanıldığı ineklerin sütünü içen insanlarda göğüs ve kolon kanserine yakalanma riskinin arttığı saptanmıştır. 1998 yılında 15 bir erkek denek kullanılarak IGF-1 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü) miktarlarının prostat kanseri üzerine etkisi incelenmiş. Normal sınırların kısmen yükseldiği deneklerde prostat kanserine yakalanma riskinin 4 kat arttığı belirlenmiştir. [42].

2.5.2 Biyolojik Çeşitlilik ve Çevre Üzerine Riskleri

Genetik modifikasyonda herbisit direnci ilk uygulamalardandır. Bu uygulamanın en ilgi çekici prensibi doğada kolayca indirgenen herbisitlerin seçiminin sağlanmasıdır. Bu

konudaki en önemli risk herbisit toleranslı bir transgenik bitkinin kontrol edilmesi zor yabani bir ota dönüşmesidir. Bir diğer tehlike ise; ürünle yabani ot arasında olabilecek bir hibridizasyon ile herbisit direnç genlerinin yabanil ota geçmesi ihtimalidir. Eğer hibrid üreyebilen bir tür olursa bu türü aynı herbisit ile kontrol etmek zorlaşabilir [59], [64].

Bununla beraber, yakın tarımsal alanda farklı bir herbisite toleranslı modifiye bir ürün varsa ve buna bir geçiş olursa çoklu bir herbisit direnci olan bitkiler gerek tarımsal alanda gerekse yabanil ortamda oluşma ihtimali söz konusu olabilir [65].

Genetik yapısı değiştirilmiş ürünlerin yabani ot öldürücülere toleranslı ürünlerden gen kaçışı ve yabani otların yakınında çapraz tozlaşma ile yayılması sonucunda tarım arazisini istila eden yabani ot öldürücülere dirençli süper yabani otlar yaratabilmesi [58], bitkilere doğal antibiyotiklerin eklenmesi ile bitkilerin antibiyotik dirençli patojenlere neden olabilmesi, vektörlerin sahip oldukları patojen özellikleri diğer organizmalara transfer etmesi (DNA' nın horizontal transferi) [65], bitkilerde dayanıklılığın gerilemesi, zararlılarda dayanıklılığın artması, bitkilerin genetik pestisitle inşasında kelebekler veya yararlı böcekler gibi diğer yaratıkların zarar görebilmesi, genetik kirlenme riski, genetik yapısı değiştirilmiş ürünlerin yerel özellikleri ve diğer habitatları tehdit edebilmesi ve biyolojik çeşitliliğe etkileri, organizmanın genom yapısındaki etkileşimden doğabilecek riskler ve genetik yapısı değiştirilmiş genlerin toprak ve su ekosistemine geçişinin doğurabileceği riskler çevre-ekosistem üzerindeki olası olumsuz etkiler olarak sıralanabilmektedir [46].

Yaşanan kaygılardan en önemlisi; aktarılmış genlerin doğal bitki türlerine geçmesi, bulundukları doğal ortamda başka türlere geçerek genetik çeşitliliğin azalmasına neden olmaları ve bu şekilde ekosistemdeki tür dağılımı ve dengesini bozma ihtimalidir. Bu konuda yapılan en somut ve önemli çalışma ABD Conell Üniversitesinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, mısır bitkisi Monarch kelebeklerinin doğal beslenme kaynağı olmadığı halde böcek öldürücü gen aktarılmış Bt (*Bacillus thuringiensis*) mısırı poleninin Kuzey Amerika' da yaygın bulunan Monarch kelebeğinin larvaları üzerinde ölümcül etkilerinin olduğu saptanmıştır. Bu olumsuz etki mısır polenlerinin kelebeğin temel besin kaynağı olan ipek otu üzerinden canlıyı etkilediği saptanmıştır. Bu çalışma

her geçen gün artan GDO’ lu ürün üretiminin dünyadaki biyolojik çeşitliliği azaltacağı konusundaki kaygıları arttırmaktadır [48].

2.5.3 Sosyo-Ekonomik Yapı Üzerine Riskleri

Modern biyoteknoloji ürünlerinin üretilmesi sonucu yerel çeşitlerin kaybı, geleneksel ürünlerde maliyet artışı, küçük çiftçilerin zarar görmesi, geleneksel üretim modelinin ve ürün çeşitliliğinin kaybı, tarım ve gıdada tekelciliğin gelişmesi olası sosyo-ekonomik riskleri oluşturmaktadır [46].

Teknoloji koruma sistemleri (terminatör teknoloji) biyoteknoloji alanında faaliyet gösteren şirketlerin çalışmalarını koruma amaçlı geliştirdikleri bir sistemdir. Bu teknoloji ile tohumların üreme yetenekleri engellenerek çiftçinin bir sonraki yıla tohum saklaması engellenmekte ve çiftçi her yıl tohumunu yenilemek zorunda kalmasına neden olmaktadır [42]. Bu da transgenik tarımın geleneksel tarımı azaltmasına neden olmaktadır. Ayrıca çiftçinin normal üretime göre %25-%100 arasında tohum konusunda daha fazla ödeme yapmasına neden olmaktadır [48], [59].

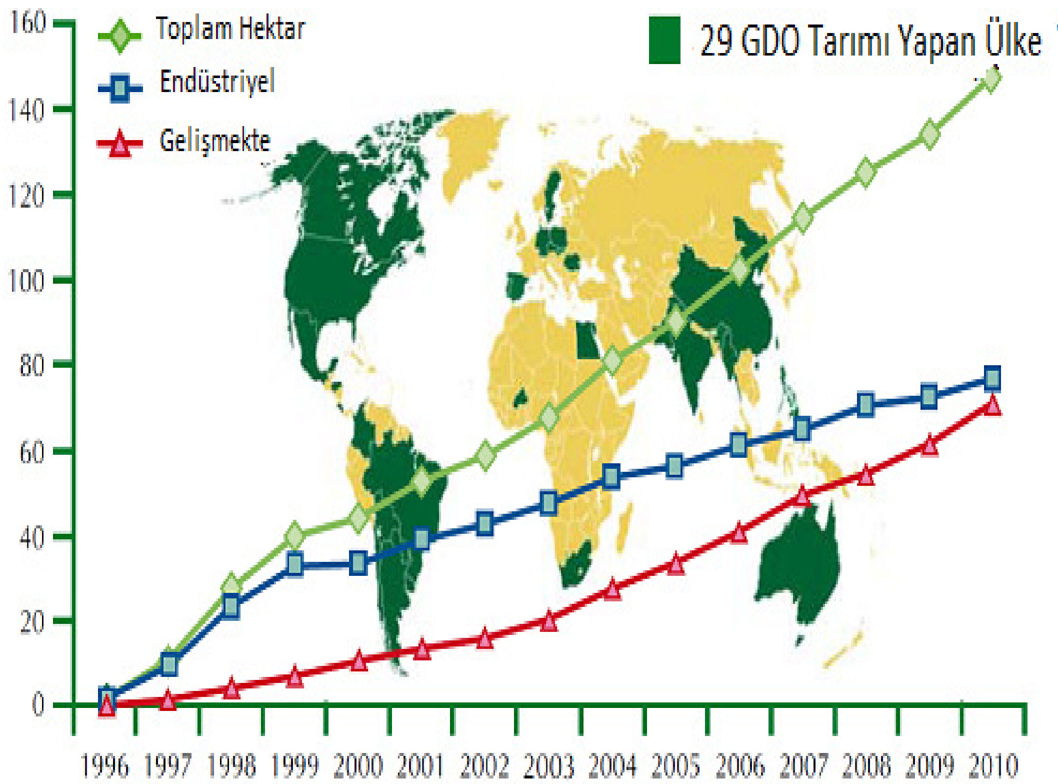
Biyoteknolojik ürünler büyük birkaç şirket tarafından üretilip patentlemekte ve dünyaya pazarlanmaktadır. Çiftçiler birkaç şirkete bağımlı hale gelmektedir. Örneğin; Arjantin‘ de 10 milyon ha alanda sadece Monsanto şirketine ait tohumlar ekilmektedir. Siyasi yönlendirme ile de bu bir baskı unsuru haline gelmektedir [42].

2.6 Dünya’ da ve Türkiye’ de GDO’ lu Bitki Üretimi

Gelişmiş ülkelerdeki araştırma-geliştirme çalışmaları içinde biyoteknoloji konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunun sonucunda, gen aktarımlı (transgenik) bitkiler son zamanlarda üzerinde en çok konuşulan bitki grubunu oluşturmaktadır. ABD ve Japonya, biyoteknolojik çalışmalara, gerek bilimsel gerekse ekonomik açıdan destek vermekte ve yatırımlar konusunda ilk sıralarda yer almaktadırlar. ABD’nin başta İngiltere olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde 1980’ lere kadar birçok biyoteknolojik yatırımlar yaptığı, daha sonraları yerel ortaklarla beraber yatırımlarını genişlettiği görülmektedir. Japonya ise gıda ve fermantasyon sektöründe biyoteknolojik gelişmelerden faydalanarak bu alandaki büyüme hızını %40’ a yükseltmiştir [42].

2007 yılı itibariyle 23 ülkede GDO' lu ürün yetiştirmek yasallaşmış, 29 ülkede de GDO' lu ürünlerin gıda ve hayvan yemi olarak tüketilmek üzere ithalatına izin verilmiştir. Güney Kore hükümeti ülkede GDO' lu ürün yetiştirilmesine izin vermezken, ithalatını serbest bırakmıştır [8].

2010 yılında küresel GDO-tarımsal alanı 148 milyon hektara ulaşarak sürdürülebilir bir büyüme ile %10 oranında artış göstererek on beş yıldır üst üste artmaya devam etmiştir (Şekil 2.10). 1996 yılında başlanan GDO-tarımsal üretimi son 15 yıldır etkileyici bir büyüme eğrisi (87 kat) göstermiştir [66].



Şekil 2.6 GDO' lu tarımsal ürünlerin global çapta üretim miktarları –milyon hektar [66]

Çizelge 2.10 1996-2010 yıllarında Dünyada GDO' lu tarım ürünü yetiştirme miktarları [66]

Tarih	Hektar (milyon)
1996	1.7
1997	11.0
1998	27.8
1999	39.9
2000	44.2
2001	52.6
2002	58.7
2003	67.7
2004	81.0
2005	90.0
2006	102.0
2007	114.3
2008	125.0
2009	134.0
2010	148.0
TOPLAM	**1,097.9**

2008 yılında dünya ekilebilir tarım arazisinin %8.8' inde GDO' lu tohum kullanılıyor ise de, toplam 125 milyon hektar ekim alanının 111 milyon hektarlık bölümü Kuzey ve Güney Amerika' dadır (Çizelge 2.11) [67].

Çizelge 2.11. Kıtalara göre GDO' lu tarım miktarları [67]

Kıta	Toplam Ekilebilir Tarım Alanı (2007)	GDO' lu Tohum Ekilebilir Alanı (2008)	GDO Tarım Alanının Toplam Tarım Alanına Oranı %
Asya	504.537.000	11.800.000	2,34
Avrupa	277.456.000	108.000	0.04
Afrika	219.183.000	1.830.000	0.83
Amerika	364.368.000	110.900.000	30.44
Okyanusya	45.573.000	200.000	0.44
Toplam	1.411.117.000	124.838.000	8.85
Dünya Toplam Bitki Örtüsü	4.931.862.000	124.838.000	2.53

2010 yılında 29 ülkede toplam 15.4 milyon çiftçi GDO' lu tarım ürünleri yetiştirmiştir. Bunların %90' ı gelişmekte olan ülkelerde yaşayan küçük çiftçilerdir. Brezilya 4.0 milyon hektarlık mutlak hektar büyüme oranı ile en yüksek artışı göstermiştir. Avustralya %184' lük oransal artış ile ilk sırada yer almaktadır [67].

Çizelge 2.12 Ülkelerin 2009-2010 GDO’ lu tarımsal alan miktarlar-milyon hektar [66]

Ülke	**2009**	**2010**
USA	64.0	66.8
Brezilya	21.4	25.4
Arjantin	21.3	22.9
Hindistan	8.4	9.4
Kanada	8.2	8.8
Çin	3.7	3.5
Paraguay	2.2	2.6
Pakistan	--	2.4
Güney Afrika	2.1	2.2
Uruguay	0.8	1.1
Bolivya	0.8	0.9
Avustralya	0.2	0.7
Filipinler	0.5	0.5
Miyanmar	--	0.3
Burkina Faso	0.1	0.3
İspanya	0.1	0.1
Meksiko	0.1	0.1
Kolombiya	<0.1	<0.1
Şili	<0.1	<0.1
Honduras	<0.1	<0.1
Portekiz	<0.1	<0.1
Çek Cumhuriyeti	<0.1	<0.1
Polonya	<0.1	<0.1
Kosta Rika	<0.1	<0.1
Mısır	<0.1	<0.1
Slovenya	<0.1	<0.1
Romanya	<0.1	<0.1
İsviçre	--	<0.1
Almanya	--	<0.1

2010 yılında ABD, Arjantin, Brezilya, Paraguay, Kanada, Uruguay, Bolivya, Güney Afrika, Meksika, Şili, Kosta Rika’ da yetiştirilen herbisit toleranslı soya fasulyesi 73.3 milyon hektarlık üretim ile ilk sırada yer almaktadır ABD, Kanada, Güney Afrika, Filipinler, Brezilya, Honduras, Arjantin ve Şili’ de ticari olarak yetiştirilen mısır 28.8 milyon hektar ile ikinci sırada yer almaktadır (Çizelge 2.12) [66].

2010 yılında GDO-tarım ürünlerinin toplam market değeri 11.2 milyar dolara ulaşmıştır. Küresel ticari tohum pazarının (34 milyar dolar) %33’ ünü teşkil etmektedir. 11.2 milyar dolarlık ticari tutarın 8.9 milyar doları (%80) sanayileşmiş ülkelerde 2.3 milyar doları (%20) gelişmekte olan ülkelerde gerçekleştirilmiştir. 1996 yılından bu yana GDO’ lu tarımsal üretim küresel değeri 73.5 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. 2011 yılı

için GDO’ lu tarımsal üretim değeri yaklaşık 12 milyar dolar olarak tahmin edilmektedir [66].

Çizelge 2.13 2010 yılı ekimi yapılan GDO’ lu ürünlerin miktarları ve oranları [66]

Ürün	Yetiştirilen Alan	Oran (%)
Herbisit Toleranslı Soya	73.3	50
Stacked Traits Mısır	28.8	19
Bt Pamuk	16.1	11
Bt Mısır	10.2	7
Herbisit Toleranslı Mısır	7.0	5
Herbisit Toleranslı Kanola	7.0	5
Stacked Traits Pamuk	3.5	2
Herbisit Toleranslı Pamuk	1.4	1
Herbisit Toleranslı Şeker pancarı	0.5	<1
Herbisit Toleranslı Alfalfa	0.1	<1
Diğerleri	0.1	<1
Toplam	**148.0**	**%100**

Ülkemizde Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik’ e göre ticari olarak genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi yasaklanmıştır [68]. Buna rağmen, 20’ye yakın ilin pazarlarından alınan domates ve patateslerin GDO’ lu ürün olduğu saptanmıştır. Bunların hemen hemen tümü, Türkiye’ye kaçak yollarla giren GDO tohumlarının hiçbir denetime tabi tutulmadan tarlalarda veya seralarda ekilmesi sonucunda üretilmektedir [44].

2.7 Dünya ve Türkiye’de Biyogüvenlik ile İlgili Yasal Düzenlemeler

GDO’ larla ilgili AB mevzuatı son yıllarda halkın kaygıları ve bilimsel gelişmeler ışığında yenilenmiştir. Avrupa Birliği’nin GDO’ larla ilgili yeni yasal çerçevesi Nisan 2004' de tamamen yürürlüğe girmiş ve genetik yapısı değiştirilmiş gıda, yem ve ürünlerle ilgili açık, şeffaf ve sıkı kurallar koymuştur. Avrupa Birliği’nin GDO’ lar hakkındaki mevzuat çerçevesi, özellikle Avrupa’ daki ürün ithalatçılarının zorunlulukları ve üçüncü ülkelere ürün ihracatçılarının zorunlulukları söz konusu olduğunda Cartegena Biyogüvenlik Protokolü’ nü dikkate almaktadır. GDO’ ların izinlerini düzenleyen sistem AB’ nin uluslararası ticaret taahhütleri ve Dünya Ticaret Örgütü (WTO) kuralları ile uyumlu;

açık, şeffaf ve ayrımcı olmayan bir sistemdir. AB 11 Eylül 2003'te yürürlüğe giren Cartegena Biyogüvenlik Protokolü'ne taraftır. Bu protokol, Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) Biyolojik Çeşitlilik Konvansiyonu'nun GDO' ların sınır ötesine taşınmasında insan sağlığı ve biyolojik çeşitliliğin korunmasını küresel ölçekte sağlamak için, ortak kurallar saptamayı amaçlamaktadır. Cartegena Biyogüvenlik Protokolü, AB içinde GDO' ların kullanımını düzenleyen yasal çerçeve ile birleştirilmiştir. Direktif 2001/18/AT bu yasal çerçevenin temelidir (ab mevzuat). Direktif 2001/18/AT' nin şartlarına GDO' ların sınır ötesi hareketleri ile ilgili 1946/2003/AT sayılı düzenleme eklenmiştir. Buna göre; çevreye kasıtlı salınımı amaçlanan GDO' ların ihracatı için zorunlu olarak resmi duyuruda bulunulmasını ve ilk sınır aşırı dolaşımından önce özel iznin sağlanmasını, GDO' ların kazayla yayılımı konusunda, halkın ve uluslararası ortakların zorunlu bilgilendirilmesinin sağlanmasını, gıda, yem veya işlenmiş olarak kullanılan GDO' ların ihracatı ile ilgili bir dizi kuralları düzenlenmesini, ihracatı yapılacak olan GDO' ların tanımlanmasını içermektedir [69].

1139/98 sayılı Konsey düzenlemesini tadil eden, 49/2000 sayılı düzenleme, yönerge 79/112/AET'de var olandan başka GDO' dan üretildiği kesin olan gıdaların etiket üzerinde zorunlu bildirilmesini düzenlemektedir. Bu direktifte etiketleme için belirtilen GDO tolerans değeri %1 olarak belirtilmiştir [46]. (EC) 1829/2003 sayılı Yönetmelik kapsamı ve Etiketleme Direktifi' nin "bileşen" tanımı dışında kalan ürünlerin yanı sıra, müstakil bileşen bazında GDO materyal mevcudiyeti %0.9' u geçmeyen gıda mamulleri de GDO etiketleme zorunluluğundan muaftır. 49/2000 sayılı yönetmelikte belirtilen eşik değerle karşılaştırıldığında, yeni değer %0.1 mertebesinde bir indirim anlamına gelmektedir [24]. Avrupa Komisyonu tarafından ruhsat verilmemiş GDO' lar için maksimum %0.5' lik bir kontaminasyon seviyesi kabul edilecektir. Avrupa Birliği' nde bileşen listesi içeren bir gıda kaynağı söz konusu olduğunda üründe GDO içeren bileşen açıkça belirtilmektedir. Bununla beraber, ürün bir bileşen listesinden oluşmuyorsa ve ürün GDO kaynaklı ise bu durumda da ürününü adının yer aldığı bölümde açıkça belirtilmektedir [47].

Japonya' da etiketleme sınırı %5 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2.14) [38].

ABD' de GDO' lu bitkilerle üretilen ürünlerde etiketleme zorunluluğu bulunmamaktadır [31]. ABD' de gıda kaynaklarının güvenirliği ve sağlıklı olması (et ve kümes hayvanları

hariç) ABD Gıda ve İlaç İdaresi (US FDA) tarafından düzenlenmektedir ve bu ajans GDO' ların etiketlenmesine karşıdır. Çevre Koruma Ajansı (EPA) gıda güvenliği açısından GDO' lara karşı tüketicilerin korunmasına özel önem verilmesi gerektiğini belirtirken, Amerikan Tıp Birliği (AMA) bu ürünlerin etiketlenmesinin zorunlu olmasını ve genetiği değiştirilmiş gıdalar için tüketici güvenliğinin henüz açık olmadığının belirtilmesi gerektiğini savunmaktadır [38], [70].

Çizelge 2.14 Dünya ülkelerinin GDO etiketleme limit ve şartları [1]

Ülke	Etiketleme	Oran %
Avrupa Birliği (25 Ülke)	Zorunlu	0.9
Norveç	Zorunlu	2
Macaristan	Zorunlu	2
Rusya	Zorunlu	0.9
Avusturya/Yeni Zelanda	Zorunlu	1.0
Brezilya	Zorunlu	1.0
Çin	Zorunlu	1.0
İsrail	Zorunlu	0.9
Suudi Arabistan	Zorunlu	1.0
İsviçre	Zorunlu	1.0
Güney Kore	Zorunlu	3.0
Endonezya	Zorunlu	5.0
Tayvan	Zorunlu	5.0
Tayland	Zorunlu	5.0
Japonya	Zorunlu	5.0
Amerika	İsteğe Bağlı	5.0
Kanada	İsteğe Bağlı	5.0
Güney Afrika	İsteğe Bağlı	1.0
Filipinler	İsteğe Bağlı	--

Ülkemizde GDO' lu ürünlerin gıda ve yem olarak üretilmesini, kullanılmasını, ithalini, ihracını ve deneysel amaçlarla kullanılmasını düzenlemek üzere kanun ve yönetmelikler yayımlanmıştır. Transgenik bitkiler ile ilgili olarak ülkemizde oluşturulan ilk mevzuat, Tarım, Hayvancılık ve Gıda Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından 14 Mayıs 1998 gün ve TGD/TOH-032 sayılı olur ile yürürlüğe konan "Transgenik Kültür Bitkilerinin Alan Denemeleri Hakkında Talimat' tır. Bununla beraber, Ülkemiz Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesine ek protokol olarak, 29 Ocak 2000' de Montreal'de kabul edilen Cartegena Biyogüvenlik Protokolü, Türkiye tarafından 24 Mayıs 2000' de imzalanıp, 17 Haziran 2003 tarih ve 4898 sayılı kanun ile onaylanmıştır Protokol, tüm GDO' ların piyasaya sürülmeden önce biyolojik çeşitlilik ve insan sağlığı

üzerinde neden olabileceği risklerin belirlenmesi, GDO' nun özelliklerine ve kullanım amacına göre laboratuvar analizleri, sera ve alan denemelerinden oluşan risk değerlendirmeye dayanarak GDO' nun ithali, ticareti ve kullanımı ile ilgili bir karar verilmesini gerektirmektedir [46].

26 Mart 2010 Biyogüvenlik Kanunu, 28 Nisan 2010 tarihinde "Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik" [71], 13 Ağustos 2010 tarihinde "Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik" resmi gazetede yayımlanmıştır. Söz konusu yönetmelikler kapsamına giren ürünler ile ilgili olarak; genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, yasaklanmıştır [68]. Bunlara ek olarak, insan ve hayvan tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç genleri içeren GDO ve ürünlerinin ithalatı ve piyasaya sunulması yasaklanmıştır [71].

"Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik" kapsamında yurt içinde yapılacak GDO ile ilgili araştırma ve geliştirme çalışmaları için başvuru şartı aranmamaktadır, sadece ithal edilecek GDO ve ürünleri için Bakanlıktan izin alınması gerekmektedir. Ancak araştırma ve geliştirme amaçlı yapılacak faaliyetin konusu ve sonucu hakkında Bakanlığa bilgi verilmesi zorunlu tutulmaktadır. Ayrıca yönetmelik insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevre ve biyolojik çeşitlilik üzerinde genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalardan veya ürünlerinden kaynaklanabilecek olumsuz etkilerin biyolojik, kimyasal ve fiziksel engellerle tamamen önlenerek kontrol edilen laboratuvar ve tesislerdeki araştırma, geliştirme, eğitim ve üretim faaliyetlerini belirli şartlar içerisinde izin vermektedir [68].

"Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik" kapsamında, gıda ve yem olarak piyasaya sürülmesi uygun görülen GDO ve ürünlerinin ithalatında ithalatçı firmadan, ithal edilecek GDO ve ürünlerinin miktarı ve içerdiği gen çeşidi ile ilgili orijin ülke veya yüklendiği ülke yetkili otoriteleri tarafından düzenlenmiş belge veya uluslararası akredite bir laboratuvardan alınmış analiz raporu istenmektedir. Ayrıca Bakanlık, denetim ve kontrol amaçlı analizler yapmaktadır. İhracatta ise alıcı ülkenin talebi doğrultusunda işlem yapılmaktadır. GDO ve ürünlerinin transit geçişinde her bir geçiş için Bakanlıktan izin alınmaktadır [68].

Söz konusu yönetmeliklerde yer alan gıda, yem ve diğer ürünlerin Bakanlık tarafından belirlenen eşik değerin üzerinde; onaylanmış GDO’ dan elde edilmiş olması veya onaylanmış GDO’ dan elde edilmiş bileşen içermesi veya GDO içermesi veya GDO’ dan oluşması durumunda etiket bilgilerinde yer alması gerekmektedir. Gıda veya yem, GDO’ lardan biri ya da birkaçını toplamda en az % 0.9 oranında içeriyor ise, GDO’ lu olarak kabul edilir. Gıda veya yemin % 0.5’ ten fazla izin verilmeyen GDO içermesi halinde ithalatına, işlenmesine, nakline, dağıtımına ve satışına izin verilmemektedir [68], [71].

BÖLÜM 3

GDO TARAMA METOTLARI

Genetik yapıları değiştirilmiş organizmaların ve türevlerinin analizleri DNA, RNA veya protein düzeyinde farklı yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Bunun yanı sıra, herbisitlere karşı direnç geni taşıma olasılığı olan tohumlarda, fenotipik olarak herbisit uygulamaları da yapılmaktadır. Genetik yapıları değiştirilmiş organizmaların analizlerinde kullanılacak olan DNA, RNA veya protein örneğinin kalitesi analizin sonucu açısından önem taşımaktadır [25].

3.1 Protein Bazlı GDO Tarama Yöntemleri

Protein bazlı GDO tarama metodu daha çok genetik olarak modifiye edilmiş ürünü hedefler. Eğer modifiye edilmiş gen hücrede inaktif hale getirilmişse bu yöntemler genetik modifikasyonu tayin etmede kullanılamaz [1], [35].

ELISA ve Bioassay yöntemleri GDO kontaminasyonlarında spesifik proteinlerin tespiti amacıyla kullanılmaktadır [72]. Protein bazlı GDO analizinde en yaygın olarak kullanılan yöntem Elisa yöntemidir. Elisa yöntemi yüksek derecede otomasyon ve verim sağlamaktadır. Ancak açığa çıkan yeni protein miktarları tüm bitki yayılmış halde bulunmamaktadır. Örneğin; mısırda en yüksek değerler tohum yerine yapraklarda yer almaktadır. Mikrotiter kuyular yerine şeritlerin kullanılması ile Elisa yönteminin bir varyasyonu olan yanal akış şeridi teknolojisi ortaya çıkmıştır. Bu yöntem, basit laboratuvar malzemeleri ile yapılabilecek ve önemli pratik değerler ile sonuçlanacak yarı-kantitatif testler önermektedir. Yanal akış yönteminde, 5-10 dakikada sonuç alınabilmekle beraber, ekonomiktir, nokta satış uygulaması daha kolaydır ve gıda zincirinin başlangıcında erken tarama yöntemi olarak oldukça uygundur [1]. Western

blot yöntemi hedef proteini belirlemek için uygun kaliteli sonuçlar sağlayan oldukça spesifik bir yöntemdir, rutin testler için kullanılmaktadır [2], [34].

3.2 RNA Bazlı GDO Tarama Yöntemleri

Bu metot RNA molekülü ve sentetik bir RNA veya DNA molekülü (primer) arasındaki özel bağlanmaya dayalıdır. Primer, başlangıç RNA molekülünün nükleotid dizilimine tamamlayıcı olmalıdır. Prosedür için gerekli olan özel primerlerin tespit edilmesi için başlangıç RNA molekülünün yapısı hakkında önceden bilgi sahibi olmak gerekmektedir [1].

RNA çalışmalarının en önemli aşaması yapısını koruyan parçalanmamış RNA izolasyonudur. RNA izolasyonunda çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerden seçim yapılırken RNA' nın kullanımındaki amaç önemli bir parametredir. İzolasyonun temel aşamaları genel olarak;

1. Hücre çeperinin ve membranın parçalanması
2. Hücre lizatının santrifüjlenmesi ile RNA' nın diğer makromoleküllerden ayrılması aşamalarından oluşmaktadır [35].

RNA konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmektedir. Elektrofotometrik yöntemlerle analizi gerçekleştirilmektedir [34], [35].

3.3 DNA Bazlı GDO Tarama Yöntemleri

DNA bazlı analiz yöntemlerine başlamadan önce DNA izole edilmelidir. İzole edilen nanogram veya mikrogram düzeyindeki miktarlarının belirlenmesinde absorbsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin doğrudan görüntülenmesinde veya özgün dizilerde kesim yapan restriksiyon endonükleaz enzimlerinin etkisi sonucu oluşan farklı boyutlardaki DNA parçalarının saptanmasında elektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır [35].

3.3.1 DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

GDO tespiti için tasarlanan analitik metotların geneli DNA bazlıdır, protein bazlı çalışmalar işlenmiş ürünler için uygun değildir [5]. DNA ile yapılacak genetik analizlerde

ilk olarak yüksek moleküler ağırlıklı DNA moleküllerinin saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. DNA izolasyonu temel olarak hücrenin parçalanıp DNA' nın açığa çıkması, denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein yapısının çözülmesi ve DNA' nın çözünür duruma getirilmesi, DNA'nın enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makro moleküllerden ayrılması aşamalarından oluşmaktadır [35].

DNA izolasyonunun ardından farklı özellikteki veya farklı kaynaklı DNA moleküllerinin fraksiyonlandırılması gerekmektedir. Tek ve çift zincirli DNA moleküllerini ve plazmid DNA' sı ile genomik DNA' yı birbirinden ayırmada kromatografik tekniklerden, daha yüksek ayırma gücüne sahip jel elektroforezinden yararlanılmaktadır. Rekombinat DNA teknolojisi çalışmalarında plazmidler taşıyıcı DNA (vektör) olarak kullanılmakta bu sebeple plazmidlerin izole edilmesi için kullanılan yöntemlerde araştırmalar sürmektedir [35].

3.3.2 Southern Blot Analiz Yöntemi

Bu metot izole edilmiş DNA parçasının nitroselüloz veya naylon memranlar üzerinde eşleneği olan DNA parçası ile hibridizasyonuna ve hibridizayonun ardından radyoaktif, kimyasal ya da floresan yöntemlerle tespit edilmesi tekniğine dayanmaktadır [73]. İlk yıllarda probların işaretlenmesinde P32, S35, H3 radyoizotopları yaygın bir şekilde kullanılmış ve radyoaktivitenin belirlenmesi için otoradyografiden yararlanılmıştır. Radyoaktivitenin beraberinde getirdiği tehlikeler sebebi ile araştırıcılar radyoaktif olmayan yeni yöntemlere yönelmişlerdir. Geliştirilen radyoaktif olmayan, Digoksigenin-anti-digoksigenin, yabanturpu (*Armoracia lapathifolia*, "horseradish") peroksidaz, biotin-streptavidin sistemlerinde melezlenen probun belirlenmesi kromogenik (kolorimetrik) veya ışık oluşumuna neden olan (kemoluminogenik) substratlar kullanılmaktadır [34], [35].

3.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR tekniği, ilk olarak 1985 yıllında Cetus firması araştırıcıları tarafından geliştirilmiş olup nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır [74]. PCR hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı

verilen spesifik komplementer oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq) kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan; oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir. Bu hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA' lar arasında olsalar bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilip kolayca ayrılabilir [75], [76].

Bu teknikte kalıp olarak kullanılan tek ya da çift zincirli DNA molekülüne ilave olarak, iki oligonükleotid primer, dNTP (deoksiribonükleozidtrifosfat), ısıya dayanıklı polimeraz enzimi ve buffer içerisindeki magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyulur [34].

PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 3.1.):

DNA Zincirinin Açılması (Denatürasyon)

Kalıp DNA 92-95 ^{o}C' de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir [34], [77], [78], [79].

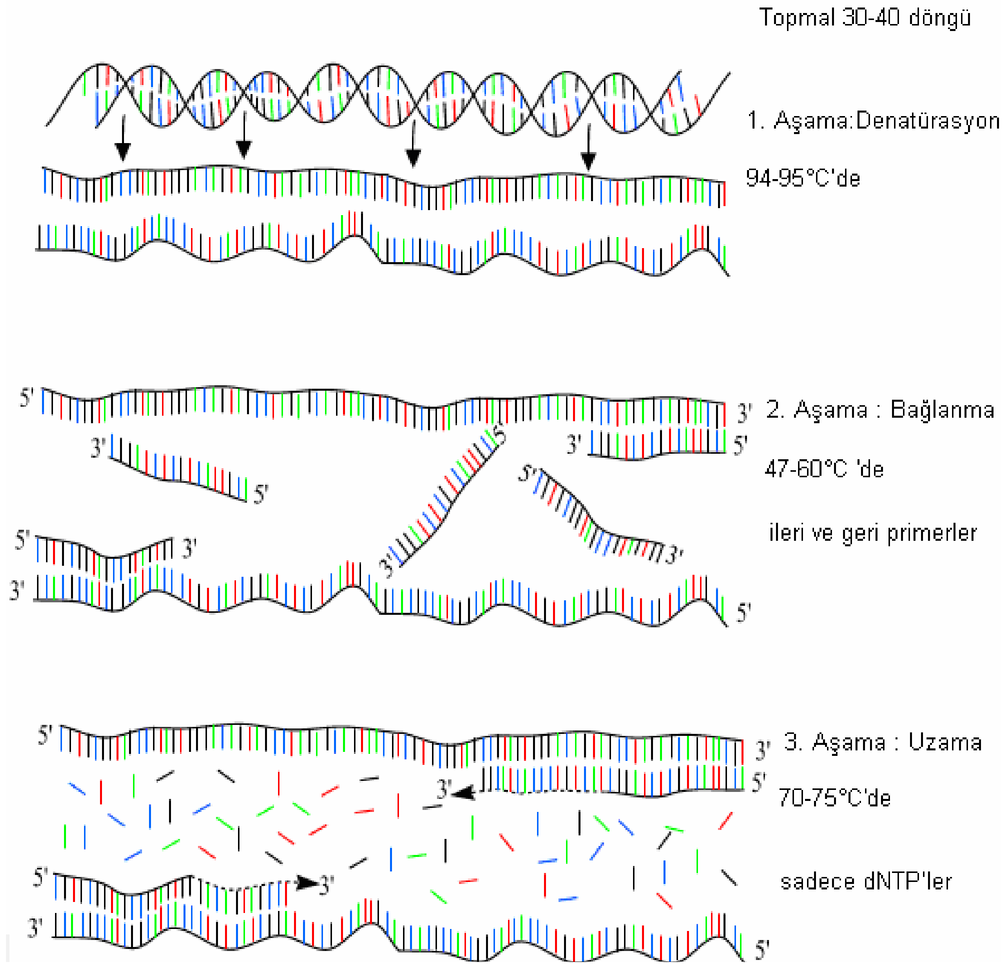
Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Bağlanma)

Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 ^{o}C' ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [34], [77], [78], [79].

Primer Uzaması

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polimeraz) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polimeraz 72 ^{o}C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır [34], [77], [78], [79].

Üç basamaktan (denatürasyon, bağlanma, uzama) oluşan işlem, bir PCR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamit jellerde yürütüldükten sonra, etidyum bromür veya gümüş nitrat ile boyanarak gözlemlenir [1], [77].



Şekil 3.1 PCR’ da temel aşamalar [80]

3.3.3.1 Real-Time PCR

Real-Time PCR, klasik PCR’ ın tersine, reaksiyonun bitmesini beklemeye gerek olmaksızın reaksiyonun durumunun izlenebilmesini sağlayan gelişmiş bir teknolojidir. Kantitatif PCR olarak da özetlenebilen teknik temel olarak; her PCR döngüsü sonunda üretilen DNA miktarıyla orantılı olarak yükselen floresan sinyalin ölçülmesi esasına dayanmaktadır [25].

Real-time PCR, klasik PCR ile karşılaştırıldığında kısa zamanda (20 dk-2 saat) güvenilir data üretebildiği için tercih sebebidir. Bununla beraber, diğer avantajları;

- Çok uygulamalı çalışmalarda vakit kazandırması
- DNA ve RNA’ nın çok hassas bir şekilde tespit edilebilmesi

- Az miktarda başlangıç materyaliyle çalışılması veya çok sayıda gen ifadesinin sınırlı RNA örneklerinde belirlenmesine imkan vermesi şeklinde sıralanabilmektedir [25].

Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalmaktadır [74].



Şekil 3.2 Real-Time PCR

Real-Time PCR' da oluşan ürünü, verdiği floresan sayesinde raporlayan bir raportöre ihtiyaç vardır. Raportör, meydana gelen ürün miktarını yansıtan bir floresan sinyal oluşturmaktadır. İlk döngüler sırasında bu sinyal zayıftır. Ürün miktarı arttıkça sinyal miktarı da artış gösterir ve bu artış üstel olarak devam eder. Daha sonra bu artış sona erer ve doygunluk seviyesine ulaşır. Bu teknikte reaksiyonun her bir döngüsünde reaksiyon boyunca artan ve elde edilen PCR ürünüyle paralellik gösteren floresan ölçümü için, çift zincirli DNA' ya bağlanan boyalar veya floresan ısıma yapan diziye özgü problardan faydalanılır [80].

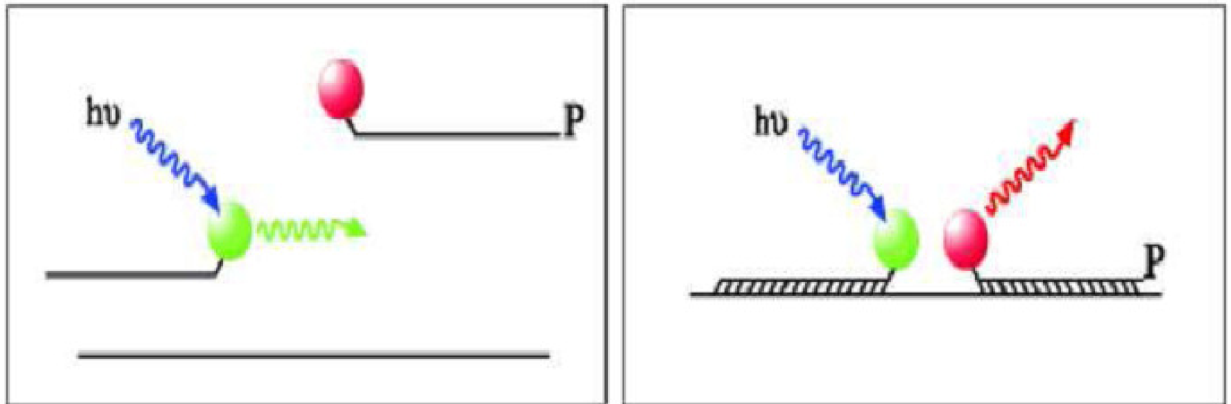
Hedefe Özgü Problarla Floresan Ölçümü

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu kez söz konusu spesifik bölgenin saptanmasında floresan işaretli hedefe özgü problar kullanılır. Probların en büyük avantajı analizin duyarlılığını artırmaları ve değişik türlerin aynı tüp içerisinde amplifikasyonuna dayanan çoklu çalışmaların uygulanmasına izin vermesidir.

İyi bir prob serbest halde zayıf floresan verirken hedefe bağlandığı durumda kuvvetli floresan vermelidir ve spesifikliği yüksek olmalıdır. Real-Time PCR tekniğinde kullanılan en yaygın floresan işaretli problar "TaqMan" prob, "Moleküler beacon" , "FRET Hibridizasyon Probları" ve "Scorpion" dur [74], [80].

FRET Problar

"LightCycler®" PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiş olan bu teknikte hedef DNA dizisi üzerinde birbirine bitişik olarak hibridize olan iki prob kullanılır. Bunlardan birinin 3' ucunda floresan işaretli boya (donor), diğerinin 5' ucunda ise alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. Problar hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) olarak bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İşaretli prob (donor) PCR sırasında harici bir ışık kaynağı tarafından uyarıldığında açığa çıkan enerji bitişiğindeki ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresan oluşumuna yol açmaktadır (Şekil 3.3). "Fluoresance Resonance Energy Transfer, (FRET)" olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresan miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifade ile PCR süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır [79], [80].

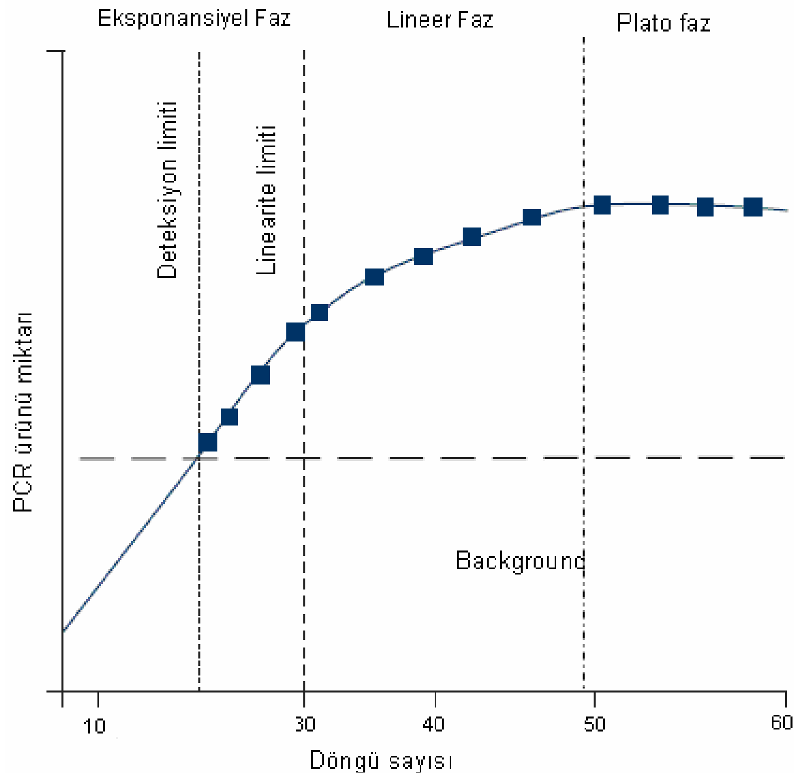


Şekil 3.3 FRET prob prensibi [80]

Real-Time PCR Çalışma Basamakları

Real-Time PCR' da ürün miktarı arttıkça oluşan sinyal miktarı da artmakta ve bu artış üssel olarak devam etmektedir. Bir süre sonra bu artış sona ererek doygunluk seviyesine ulaşmaktadır. Dolayısıyla tipik bir Real-Time PCR' da temel 3 fazdan söz

etmek mümkündür. Her bir döngüde ürün miktarının iki katına çıktığı faz "Eksponansiyel Faz", reaksiyon bileşenlerinin tükenmeye başladığı, reaksiyonun yavaşladığı ve ürünlerin yıkılmaya başladığı faz ise "Lineer Faz" olarak adlandırılır. Reaksiyonun durduğu, daha fazla ürünün oluşmadığı ve uzun süre bu safhada kalındığında PCR ürünlerinin degrade olduğu faza ise "Plato Fazı " denilmektedir (Şekil 3.4). Tipik bir Real-Time PCR çalışmasında tüm örneklere ait cevap eğrileri aynı aşamada doygunluk seviyesine ulaşır. Örneklerin cevap eğrileri belli bir eşik floresan sinyal seviyesine ulaştırmak için gerekli amplifikasyon döngülerinin sayısı karşılaştırılarak farkları belirlenir. Eşik değere ulaşmak için gerekli döngü sayısı Ct (threshold cycle) değeri olarak adlandırılır [80].



Şekil 3.4. Real-Time PCR' da cevap eğrisi [80]

BÖLÜM 4

SOYA FASULYESİ

4.1 Soyanın Morfolojik Özellikleri

Soya, ekonomik olarak yetiştirilen yağ bitkileri arasında yağ oranı ve kalitesi bakımından en başta gelen ürünlerden biridir. Genel olarak %13.5-24.6 oranında yağ içermektedir [81].

Çizelge 4.1 Soyanın bileşimi [81]

Besin Maddeleri	En Az (%)	En Çok (%)	Ortalama (%)
Kül	3.3	6.5	4.6
Su	5.0	9.2	8.0
Protein	29.6	50.3	40.0
Yağ	13.5	24.6	18.0
Pentozanlar	3.8	5.5	4.4
Şekerler	5.6	9.5	7.0
İnvert şeker	4.8	7.4	5.8
Diğer karbonhidratlar	4.6	8.9	5.6
Selüloz	2.8	6.3	3.5
Potasyum	1.3	2.2	1.7
Lesitin	0.6	1.5	1.0
Kalsiyum	0.2	0.5	0.3
Fosfor	0.4	0.8	0.6

Soyada bulunan en önemli bileşin yaklaşık %40 oranındaki proteindir. Soyada bulunan zengin protein bileşimi, %65.3-%92.7 sindirilebilme özelliğine sahiptir [81].

Soya fasulyesinde %3 sakkaroz, %1 rafinoz, %4 stakiyoz, %5.6 çözünmeyen karbonhidratlar, %0.4 kükürt ve magnezyum, %1.7 potasyum, %0.3 kalsiyum, %0.7 fosfor, %0.2 sodyum ile demir, manganez, bakır, çinko, alüminyum bulunmaktadır [81].

Çizelge 4.2 Soya proteininin aminoasit kompozisyonu [81]

Aminoasit	Soya Fasulyesi Tanesinde (g/16 g Nitrojen)	Yağı Alınmış Küspede (g/16 g Nitrojen)
İzolösin	4.5	4.8
Lösin	7.8	7.8
Lisin	6.4	6.1
Methionin	1.3	1.4
Sistein	1.3	1.7
Fenilalanin	4.9	5.0
Trosin	3.1	3.8
Treonin	3.9	4.3
Triptofan	1.3	1.5
Valin	4.8	5.2
Arginin	7.2	7.1
Histidin	2.5	2.5
Alanin	4.3	4.5
Aspartik asit	11.7	11.5
Glutamik asit	18.7	18.5
Glisin	4.2	4.5
Prolin	5.5	5.6
Serin	5.1	5.6

Çizelge 4.3 Soyanın vitamin kompozisyonu [81]

Vitamin	Miktarı (µg/g)
Tiamin	11.0-17.5
Riboflavin	3.4-3.6
Niasin	21.4-23.0
Pridoksin	7.1-12.0
Biyotin	0.8
Pantotenik Asit	13.0-21.5
Folik asit	1.9
İnositol	2300
Kolin	3400
B-Karoten	0.18-2.43
Vitamin E	1.4
Vitamin K	1.9

Son yıllarda sağlık için vazgeçilmez bir bitki olduğunun ortaya konulmasıyla, başta ABD olmak üzere pek çok Avrupa ülkesinde de tüketimi ve üretimi yaygınlaşmıştır. Nitekim bir çok bilimsel çalışmada soyanın; kanserin büyümesine engel olduğu, osteoporoz riskini azalttığı, kronik böbrek hastalıkları için faydalı olduğu kolesterolü düşürdüğü ve kroner kalp rahatsızlıklarına iyi geldiği ispatlanmıştır.

Soya fasulyesinin dünya tüketimindeki hızlı artışının nedeni, sadece insan sağlığına faydalı bir besin olmasından kaynaklanmamaktadır. Pek çok sanayinin hammaddesi

olarak da kullanılan bu ürünün içerdiği özellikler, 1980'li yıllarda ABD'de incelenerek, bio-dizel yakıt olarak kullanılabileceği de ortaya konulmuş ve yenilenmesi gereken enerji kaynaklarıyla birlikte kullanımı üzerine dikkat çekilmiştir. Soya fasulyesi, ham olarak tüketilebilmekle birlikte protein bakımından zengin bir yağ bitkisi olması nedeniyle, işlenerek yağ ve protein ürünleri olarak da tüketilmektedir. Günümüzde, soyadan (kahve kreması, pişirme yağı, dolgu yağı, margarin, mayonez, ilaç, yem, farmasötik, insektisid, kauçuk, yağ, anti korozyon maddeleri, anti statik maddeler, macun bileşenleri, inşaat malzemeleri, beton katkı maddeleri, bakım yağları, mürekkep, baskı maddeleri, kalemler, dezenfektan, yapıştırıcı, elektrik izolasyon maddeleri, analitik kimyasallar vb.) sayı ve çeşit bakımından oldukça fazla ürün elde edilebilmektedir [82].

4.2 Dünya' da ve Türkiye' de Soya Üretimi

Dünya'da soya fasulyesi üretimi 1950'li yıllardan başlayarak hızlı bir şekilde artış göstermiştir. Soya yağının, sıvı yağ üretimi içerisinde en büyük paya sahip olması da bu artışı desteklemiştir. Soya fasulyesinin Uzak Doğu kökenli olmasına rağmen, günümüzde en büyük üreticisi ABD'dir. Kullanım alanlarının yaygınlaşmasına paralel olarak dünya tüketiminde önemli bir yere sahip olan soya fasulyesi üreticisi diğer ülkelerin basında Brezilya, Arjantin, Çin Halk Cumhuriyeti ve Hindistan gelmektedir [82].

Çizelge 4.4 2009 Yılı Dünya' da soya üretim miktarları [83]

Ülke	**Üretim Miktarı (milyon ton)**	**Üretim Miktarı (%)**
ABD	80.7	38
Brezilya	57.0	27
Arjantin	32.0	15
Çin	15.5	7
Hindistan	9.1	4
Paraguay	3.9	2
Kanada	9.3	2
Diğer Ülkeler	9.3	4
TOPLAM	**210.9**	

Ülkemizin soya ile tanışması I. Dünya Savaşı sonrasında olmuştur. İlk zamanlar "Çorum Fasulyesi" olarak yayılmaya başlayan soyanın ekimi ana ürün olarak Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde yaygınlaşarak, Samsun ve Ordu illerinde 1980 yılına kadar soya üretimi yapılmıştır. 1981 sonrasında soya fasulyesi yerini mısır, çay, tütün gibi daha yüksek gelir getiren ürünlere bırakmış olup bu bölgede soyanın ekim alanları giderek azalmıştır. Zamanla soya fasulyesi ekimi İkinci Ürün Projesi kapsamında Akdeniz Bölgesine kaydırılmıştır. Bu projenin uygulamaya konmasından sonra soya ekim alanlarında 1988 yılına kadar istikrarlı bir artış sağlanmıştır. Ancak alım yapan kuruluşların depolama ve finansman gibi sorunlarının oluşu, uygulanan fiyat politikaları, üreticilerin diğer ürünlere yönelmesi sebebiyle diğer yağlı tohumlu bitkilerde olduğu gibi soya ekim alanlarında da azalma olmuştur [83]. 1988-2010 yıllarına ait soya üretimimiz Çizelge 4.5 gösterilmektedir [84].

Çizelge 4.5 1988-2010 tarihinde Türkiye' de soya ekim alanları ve üretim miktarları [84]

Yıllar	Ekilen Alan (dekar)	Üretim (ton)
1988	660 000	150 000
1989	753 000	161 000
1990	740 000	162 000
1991	495 000	110 000
1992	460 000	95 000
1993	267 500	63 000
1994	290 000	70 000
1995	310 000	75 000
1996	205 000	50 000
1997	190 000	40 000
1998	230 000	60 000
1999	240 000	66 000
2000	150 000	44 500
2001	170 000	50 000
2002	255 000	75 000
2003	270 000	85 000
2004	140 000	50 000
2005	86 000	29 000
2006	119 186	47 300
2007	86 747	30 666
2008	94 444	34 461
2009	105 210	38 442
2010	234 727	86 540

Soya üretimi Türkiye’de Trakya, Marmara, Ege, Karadeniz ve Akdeniz Bölgelerinde ana ürün olarak, Ege, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinin sulanır tarım alanlarında ise ikinci ürün olarak yapılmaktadır [83].

Çizelge 4.6 2006-2010 tarihleri arasında bölgelerimizde ekilen ve hasadı yapılan soya miktarları [84]

Yıl	**Bölge**	**Ekilen Alan (dekar)**	**Üretim (ton)**
2006	Güneydoğu Anadolu	4.350	1.067
	Doğu Marmara	209	70
	Batı Anadolu	100	28
	Akdeniz	92.502	38.502
	Batı Karadeniz	22.025	7.633
2007	Güneydoğu Anadolu	3.500	860
	Doğu Marmara	160	48
	Batı Anadolu	80	17
	Akdeniz	61.907	22.492
	Batı Karadeniz	21.100	7.249
2008	Güneydoğu Anadolu	3.000	747
	Ege	15	2
	Batı Anadolu	252	60
	Akdeniz	70.072	26.370
	Batı Karadeniz	21.105	7.282
2009	Güneydoğu Anadolu	140	33
	Ege	10	2
	Batı Anadolu	255	43
	Akdeniz	85.872	31.581
	Batıkaradeniz	18.933	6.783
2010	Güneydoğu Anadolu	2.048	404
	Ege	10	2
	Batı Anadolu	540	141
	Akdeniz	207.048	77.380
	Batıkaradeniz	25.081	8.613

BÖLÜM 5

DENEYSEL ÇALIŞMA

5.1 Deneyde Kullanılan Hammaddeler

5.1.1 Soya Tohumları ve Bisküvi

Deneylerde, Türkiye' nin 14 ilinde (Adana, Osmaniye, Samsun, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş, Elazığ, Şanlıurfa, Malatya, Konya, Erzincan, Sakarya, Bingöl, Tekirdağ) piyasaya sürülen soya tohumları kullanılmıştır. Bununla beraber, İstanbul Kuru Gıdacılar Halinden alınan 2 örnek de incelemeye alınmış, İstanbul-1, İstanbul-2 şeklinde kodlanmıştır.

Soya tohumlarında GDO analizleri 35S promotor (*Cauliflower Mosaic* Virüsünden izole edilen), NOS terminatör (*Agrobacterium tumefaciens*' ten izole edilen) bölgelerinin tespitine yönelik yapılmıştır [4].

Yapılan GDO taramasının ardından pozitif sonuç alınan bir örnek belirlenmiştir. Tohum hazırlanıp 180 ^{o}C' de 15 dakika pişirilerek bisküvi haline getirilmiş ve bu haliyle Kantitatif Real-time PCR' da analiz edilmiştir.

5.1.2 Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler

DNA izolasyonu "Wizard Genomics DNA Purification Kit" kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için kit içerisinde yer alan;

- Nuclei lysis solüsyonu

- RNase solüsyonu
- Protein precipitation solüsyonu
- DNA rehydration solüsyonu

Bunlara ek olarak;

- Merck %70 etanol
- Merck izopropanol kullanılmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi Analizi İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Merck TBE
- Saf su
- Merck agaroz jel
- Merck etidyum bromür
- Merck yükleyici boya (loading dye)

Nano Drop Spektrofotometre Analizi İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- DNA rehydration solüsyonu

GDO Tarama Analizi İçin Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

GDO tarama analizi için GDO tarama kiti (Foodproof GMO Screening Kit-Hybridization Probes) kullanılmıştır. Bu kit içerisinde yer alan kimyasal maddeler;

- *35S/NOS* tarama karışımı: İçinde *35S* promotor ve *NOS* terminatör bölgelerini çoğaltmak için geliştirilmiş hazır primer ve hibrid problar bulunduran karışım.
- Bitki geni tarama karışımı: İçinde bitki DNA' sına spesifik, hazır primer ve hibrid problar bulunduran karışım.
- GDO tarama enzim solüsyonu ve GDO tarama Reaksiyon Karışımı: Taq Polimeraz, reaksiyon tampon ve dNTP karışımı (dTTP yerine dUTP ekli) içermektedir.
- GDO tarama kontrol şablonu: Stabilize edilmiş DNA solüsyonu içermektedir.
- Saf su

Kantitatif GDO Analizi İçin Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Kantitatif GDO analizinde kantitatif analiz kiti (Foodproof GMO Soya Quantification Kit-Hybridization Probes) kullanılmıştır. Bu kit içerisinde yer alan kimyasallar;

- Soya GDO tarama karışımı: Genetiği değiştirilmiş Roundup Ready soyaya özgü *35S* promotor bölgesini taramaya yönelik tasarlanmış hazır primer ve hibrid prob karışımlarını içermektedir.
- Soya referans geni tarama karışımı: Soyada bulunan *LEKTİN* genine özgü tasarlanmış hazır primer ve hibrid problar içermektedir.
- Enzim solüsyonu ve reaksiyon karışımı: Taq polimeraz, reaksiyon tamponu ve dNTP karışımı (dTTP yerine dUTP ekli) içermektedir.
- GDO' lu soya kalibratör DNA solüsyonu: Stabilize edilmiş plazmid DNA' sı içermektedir.
- Seyreltme tamponu
- Saf su

5.1.3 Deneyde Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

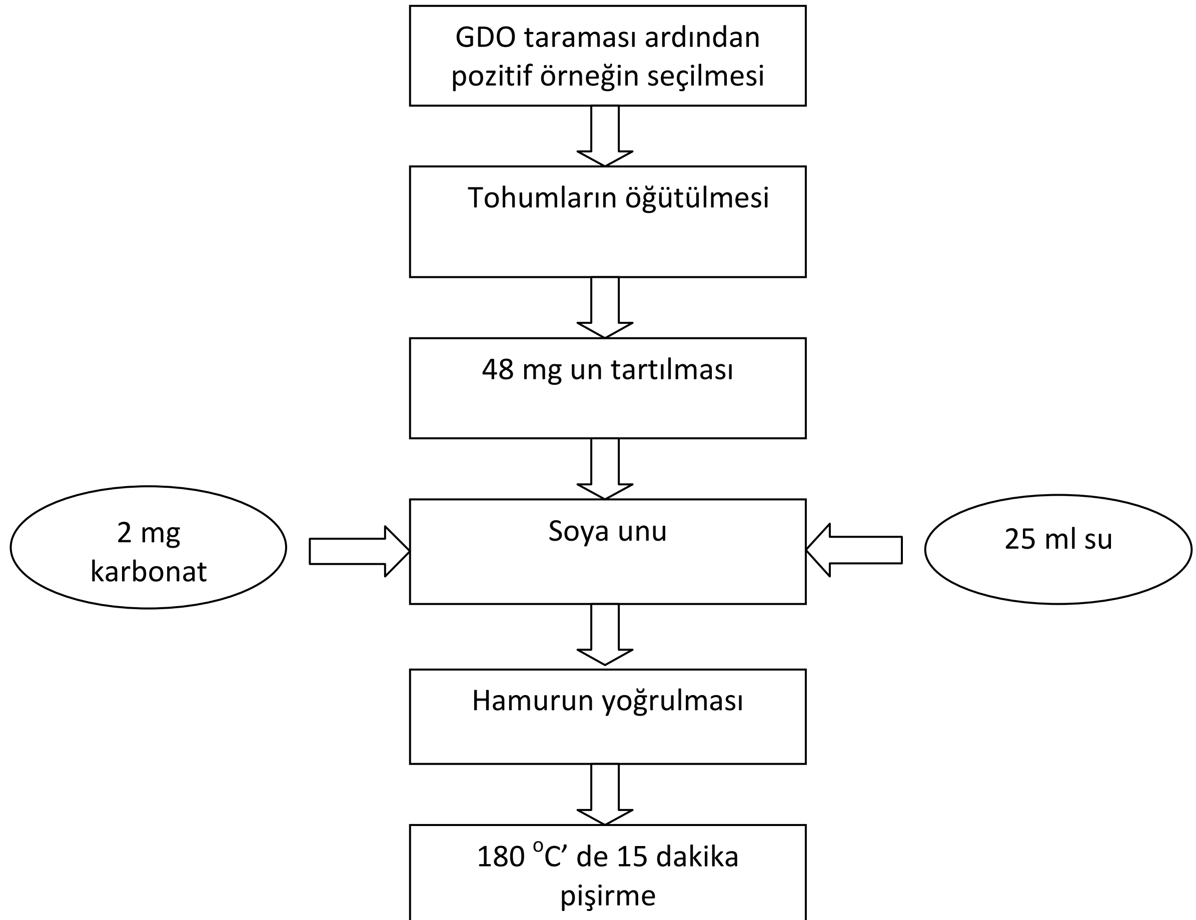
- Light Cycler 480 Real-Time PCR
- ZNanoDrop Spektrofotometre ND 1000
- Mermert Su Banyosu
- Velp Speentifica $2x^3$ Vortex
- Velp Scientifica Micro Karıştırıcı
- Beckman Coulter Microfuge 18 Santrifüj, Eppendorf 5415 R Santrifüj
- Heraeus Multifuge 32 Plat Santrifüj
- Biorad Agaroz Jel Elektroforezi
- HVD Life Science Bio TDB100 Dry Block Heating Termostat
- Sartorius BP 2215 Hassas Terazi, Libror EB3200 H4 Hassas Terazi

5.2 Deneysel Prosedür

5.2.1 Soya Tohumlarının ve Bisküvinin Hazırlanması

Tohumlar hassas terazide tartılmıştır. Her bir tohum ortalama 100-150 mg gelmektedir. Bu çalışmada numaralandırılmış her bir örnekten yarım tohum kullanılmıştır. Tohumlara, kontaminasyonu önlemek amacıyla yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, tohumlar bir behere alınarak üzerlerine eklenen %70 etanol ile 1-2 dakika çalkalanmıştır. Ardından saf su ile yıkanarak önceden 121 ^{o}C’ de 20 dakika otoklavlanmış porselen havanlara alınmıştır. Her bir tohum için ayrı bir havan kullanılarak kontaminasyon önlenmiştir. Tohumların üzerine sıvı azot eklenerek öğütülmüştür.

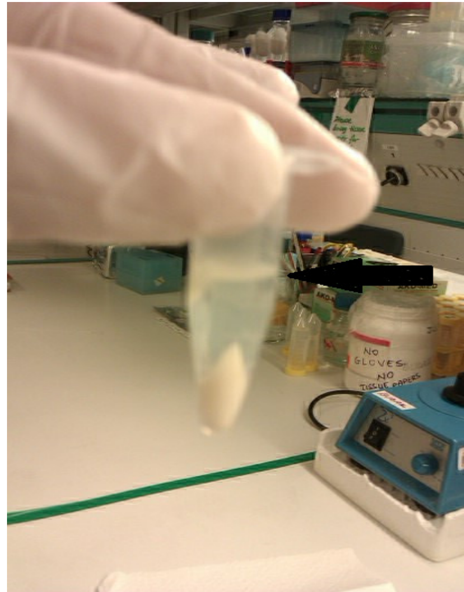
GDO tarama analizinin ardından pozitif sonuç veren bir örnek belirlenerek bisküvi için hammadde olarak kullanılmıştır. Bisküvi üretimi akım şeması Şekil 5.1’ de gösterilmektedir.



Şekil 5.1 Bisküvi üretimi akım şeması

5.2.2 DNA Ekstraksiyonu

16 adet 1.5 ml mikro santrifüj tüplerinin içlerine öğütülmüş tohumlar eklenmiştir. Tohumların üzerine 600 µl nüklei Liziz solüsyonu eklenmiş ve 1-3 saniye vortekslenmiştir. Tüpler Dry block heating termostatta 65 ^{o}C’ de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir tüpe 3 µl RNase solüsyonu eklenerek 2-5 kez çevrilerek karıştırılmıştır. Tüpler 37 ^{o}C’ de 15 dakika su banyosuna bırakılmıştır. Ardından oda sıcaklığına inmesi için 5 dakika beklenmiştir. Soğuyan tüplerin üzerine 200 µl protein precipitation solüsyon eklenerek yüksek hızda 20 saniye vortekslenmiştir. Tüm tüpler +4 ^{o}C’ deki santrifüj kullanılarak 14.000 rpm’ de santrifüjlenmiştir. Soya tohumundan hazırlanan tüplerde sıvı fazın üstünde bir tabaka tespit edilmiştir (Şekil 5.2). Bu tabakanın çöktürülmesi için tüpler 5-10 saniye vortekslenip oda sıcaklığındaki santrifüjde 12.000 rpm’ de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Çökme gözlenmeyince aynı hızda 10 dakika daha santrifüj edilmiştir.



Şekil 5.2 DNA izolasyonu sırasında tüpün üstünde oluşan tabaka

Çöken pellet içlerinde 600 µl izopropanol bulunan 1.5 ml mikro santrifüj tüplerine alınarak çevrilerek karıştırılmıştır. 12.000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İzopropanol dikkatlice uzaklaştırılmış, pellet üzerine 600 µl %70 etanol eklenerek çevrilerek karıştırılmıştır ve 12.000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırılarak, pelletin 15 dakika kuruması sağlanmıştır. Tüpler üzerine 100 µl DNA rehydration solüsyonu eklenerek 65 ^{o}C’ de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır

5.2.3 Soya Tohumları için GDO Tarama Analizi

Yapılan çalışmada Kantitatif Real-Time PCR' FRET hibridizasyon probları kullanılmıştır.

DNA Örneklerinin Hazırlanması

DNA izolasyonunu ardından örneklerin DNA konsantrasyonları Nano-Drop spektrofotometrisi kullanılarak ölçülmüştür. Tüm örneklerde DNA konsantrasyonunu eşitleyebilmek için Çizelge 5.1' de gösterilen şekilde çözeltiler hazırlanmıştır. 70 µl çözelti içinde 50 ng/µl DNA miktarı elde etmek için kullanılacak DNA miktarı Denklem 5.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$V_1 = \frac{d_2 x V_2}{d_1} \qquad (5.1)$$

V_1 = Kullanılacak DNA çözeltisi hacmi (µl)

d_1 = Kullanılacak DNA yoğunluğu (µg/µl)

V_2 = Elde edilmesi amaçlanan hacim (70 µl)

d_2 = Elde edilmesi amaçlanan DNA yoğunluğu (50 ng/µl)

Çizelge 5.1 DNA seyreltimi için kullanılan DNA ve su miktarları

Numuneler	**Kullanılan DNA Miktarı (ng)**	**Kullanılan Su Miktarı (µl)**
Adana	3427.2	61
Osmaniye	3595.8	64
Samsun	3441.6	52
Mersin	8360	54
Hatay	3529.8	61
Kahramanmaraş	3472	63
Elazığ	3582	60
Şanlıurfa	3499.8	32
Malatya	3446.1	61
Erzincan	3472	39
Sakarya	3498	37
Tekirdağ	3470	45
İstanbul-1	3522	50
İstanbul-2	3437.4	64

Erzincan ve Bingöl’ den alınan örneklerde DNA miktarı oldukça düşük değerlerde çıktığından seyreltme işlemi yapılmadan direkt 96 kuyucuklu kaba eklenmiştir.

PCR Karışımlarının Hazırlanması

Tarama kiti 2 çeşit temel karışımı içermektedir. Bunlardan biri *NOS* Tarama karışımı, diğeri bitki geni tarama karışımıdır. Bunlar ayrı ayrı kısa bir santrifüjleme ile ışıktan korumak suretiyle kuru buz içine yerleştirilmiştir. Tarama kiti içinde bulunan reaksiyon karışımından 60 µl alınarak enzim karışımının içine eklenmiştir.

96 kuyucuklu kap üzerindeki her bir kuyucuk 20 µl hacimde karışım alacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir kuyucuğa 15 µl Çizelge 5.2’ de yer alan şekilde hazırlanmış olan karışım, bunun üzerine 5 µl DNA solüsyonu eklenmiştir.

Bununla beraber, ilk genel uygulama yapılmadan önce Adana, Osmaniye Samsun ve İstanbul-2 örneklerinden oluşan bir ön çalışma yapılmıştır.

Çizelge 5.2 96 kuyucuklu kabın her bir kuyucuğuna konan PCR solüsyonu karışım miktarları

Bileşen	**Hacim (µl)**
H_2O	11
35S/*NOS* Master Karışımı veya Bitki Gen Tarama Temel Karışımı	2
Enzim Karışımı	2
Toplam	15

96 Kuyucuklu Kabın Hazırlanması

96 kuyucuklu kap, her bir örneğin 3 tekrarı yapılacak şekilde dizayn edilmiştir. 2 adet pozitif kontrol 1 adet negatif kontrol konulmuştur. Hazırlanan 96 kuyucuklu kaplar soğuk ortamda 2500 rpm’ de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

5.2.4 Soya Tohumları için Kantitatif GDO Analizi

Kantitatif analiz aşamasında taranacak olan örnekler daha önce tarama aşamasında hazırlandığından bu aşamada tekrara gerek görülmemiştir.

Seri Çözeltilerin Hazırlanması

Standart eğri çizebilmek ve verim hesabı yapabilmek amacıyla kalipratör DNA kullanılarak hazırlanacak seri çözeltilere ihtiyaç duyulmaktadır [85]. Bu sebeple 5 adet seri çözelti hazırlanmıştır. Bu oranlar Çizelge 5.3' de gösterilmektedir.

Çizelge 5.3 Kantitatif analiz için kalipratör DNA kullanılarak hazırlanan seri çözeltilerin oranları

Seyreltme Basamağı	**Seri Çözelti**	**Konsantrasyon (ng/µl)**
D0	Seyretme yapılmayan	100
D1	1:5	20
D2	1:25	4
D3	1:125	0.8
D4	1:625	1.16

Kantitatif analizi sonucunda seri çözeltilerden elde edilen veriler kullanılarak standart eğriler çizilmiştir. Bu eğrilerden yararlanılarak verim hesabı Denklem 5.2' ye göre yapılmıştır.

$$\text{Verim} = (10)^{-1/\text{eğim}} \qquad (5.2)$$

PCR Karışımlarının Hazırlanması

PCR karışımlarına ilk olarak enzim karışımlarının hazırlanması ile başlanmıştır. GDO soya enzim solüsyonu ve GDO soya reaksiyon karışımına kısa bir santrifüj uygulaması yapılmıştır. Ardından 60 µl GDO soya reaksiyon karışımından alınarak GDO soya enzim solüsyonuna eklenmiştir. Pipetle karıştırılarak kuru buzda saklanmıştır.

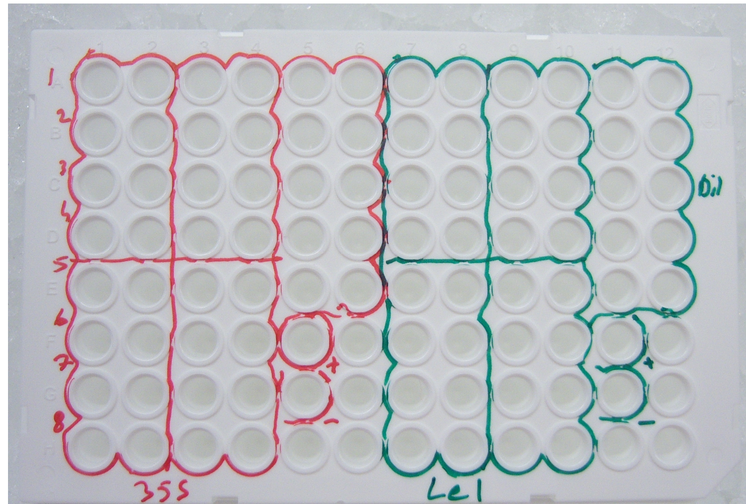
Kantitatif analiz iki tekrar ile gerçekleştirilmiştir. PCR karışımları her bir kuyucuk için 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Temel karışımlardan biri *35S* promotorunu tespite yönelik tasarlanmıştır. Diğeri ise soya referans geni taramaya (*LEKTİN*) yönelik tasarlanmıştır.

Çizelge 5.4 Kantifikasyon için kullanılan PCR solüsyonu karışım miktarları

Bileşen	Hacim (µl)
H_2O	11
Soya GDO Gen Tespit Karışımı veya Soya Referans Gen Tespit Karışımı	2
Enzim Karışımı	2
Toplam	15

96 Kuyucuklu Kapların Hazırlanması

Her bir kuyucuğa 15 µl hazırlanan temel karışımlarından konulmuştur. İncelenmek istenen her bir örnekten 5 µl her bir kuyucuğa eklenmiştir. Bununla beraber, hazırlanan her bir seri çözeltiden 5 µl eklenmiştir. Aynı şekilde pozitif kontrolde de kalipratör DNA kullanılmış olup, negatif kontrol için 5 µl su kullanılmıştır. Çalışma boyunca adı geçen 96 kuyucuklu kap Şekil 5.3' de gösterilmektedir. Hazırlanan kaplar soğuk ortamda 2500 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir



Şekil 5.3 Kantitatif Real-Time PCR' da kullanılan 96 kuyucuklu kap ve dizilimi

5.2.5 Bisküvi için Kantitatif GDO Analizi

DNA Örneklerinin ve PCR Ürünlerinin Hazırlanması

DNA izolasyonu, ticari bir kit olan Wizard Genomics DNA Purification Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun ardından örneklerin DNA konsantrasyonları Nano-Drop

spektrofotometrisi kullanılarak ölçülmüştür. Tüm örneklerde DNA konsantrasyonunu eşitleyebilmek için Çizelge 5.5’ de gösterilen şekilde çözeltiler oluşturulmuştur. 30 µl çözelti içinde 50 ng/µl DNA miktarı elde etmek için kullanılacak DNA miktarı Denklem 5.3 kullanılarak hesaplanmıştır. PCR solüsyonları Çizelge 5.4’ de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

$$V_1 = \frac{d_2 x V_2}{d_1} \quad (5.3)$$

V_1 = Kullanılacak DNA çözeltisi hacmi (µl)

d_1 = Kullanılacak DNA yoğunluğu (µg/µl)

V_2 = Elde edilmesi amaçlanan hacim (30 µl)

d_2 = Elde edilmesi amaçlanan DNA yoğunluğu (50 ng/µl)

Çizelge 5.5 DNA seyreltimi için kullanılan DNA ve su miktarları

Numuneler	Kullanılan DNA Miktarı (ng)	Kullanılan Su Miktarı (µl)
Bisküvi	1592.1	21

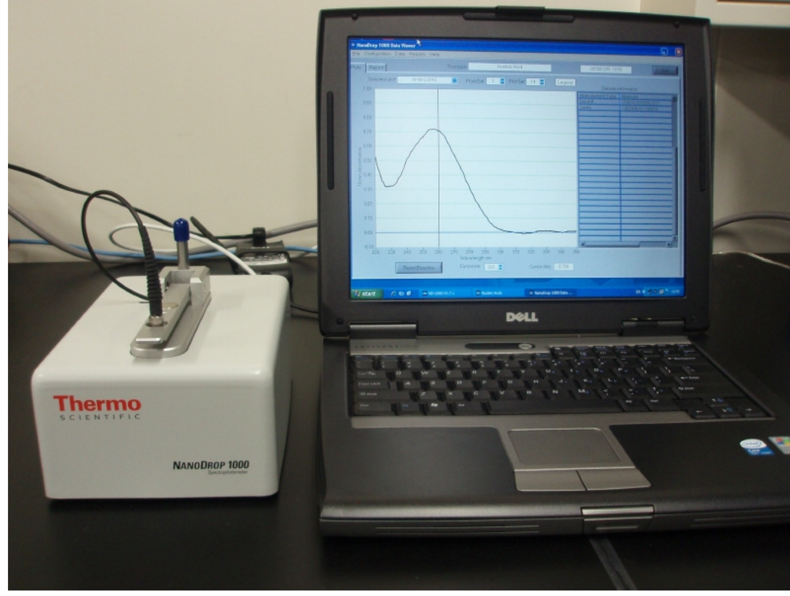
96 kuyucuklu Kapların Hazırlanması

Çizelge 5.5’ e göre hazırlanan solüsyonlar 96 kuyucuklu kap üzerine dağıtılmıştır. Analiz örnekleri ile birlikte bir negatif örnek bir de pozitif örnek (kalipratör DNA) de kaba eklenmiştir.

5.3 Analiz Yöntemleri

5.3.1 Spektrofotometre ile Konsantrasyon Ölçümü

Ölçülmek istenilen örnekler kısa bir şekilde santrifüj edilmiştir. İlk olarak Nano-Drop spektrofotometreye 1 µl DNA rehydration solisyonundan eklenmiştir. Ardından temizlenen pedestala 1 µl daha DNA rehydration solisyonu daha konularak blank edilmiştir. Her bir örnekten 2 µl alınarak pedestale yerleştirilmiş ve ölçüm yapılmıştır.



Şekil 5.4 Çalışmada kullanılan Nano-Drop Spektrofotometresi

5.3.2 Agaroz Jel Elektroforezi ile DNA Analizi

DNA fragmanlarının saflığını gözlemlemek amacıyla Agaroz Jel Elektroforezi kullanılmıştır [34]. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözelti Çizelge 5.6' da gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 5.6 Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan çözelti oranları-1

Kullanılan Kimyasal	Miktar
10X TBE	50 ml
Saf Su	1000 ml
%1,5 Agaroz Jel	1,5 mg

Hazırlanan çözelti ısıtılıp çözülmüş, ardından 100 ml' lik farklı bir erlene alınarak üzerine 2 µl etidyum bromür eklenmiş ve donması için 15 dakika beklenmiştir. 250 µl PCR tüplerine Çizelge 5.7' deki şekilde hazırlanan çözeltiden eklenmiştir.

Çizelge 5.7 Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan çözelti oranları-2

Kullanılan Kimyasal	Miktar (µl)
Saf Su	6
DNA	2
Yükleyici Boya	2

Spektrofotometrede yapılan ölçümlerde DNA miktarı düşük çıkan Konya ve Bingöl' den alınan örneklerde kullanılan madde miktarları değiştirilmiş ve 4 µl su ile 4 µl DNA kullanılmıştır. Tüpler vortekslenmiştir. Jelin donmasının ardından üzerine tampon eklenmiştir. Jel üzerinde oluşan kuyucuklara 8 µl hazırlanan solüsyondan konularak 100V' da 33 dakika analize bırakılmıştır.



Şekil 5.5 Çalışmada Agaroz Jel Elektroforezi için kullanılan cihaz

5.3.3 GDO Tarama Analizi

Tüm örneklerde GDO taraması Kantitatif Real-Time PCR kullanılarak yapılmıştır. GDO tarama çalışmasında kullanılan kit Carousel-Based sisteme göre optimize edilmiştir. Çalışmada kullanılan LightCycler 480 Real-Time PCR' a uyumlaştırılmaya çalışılmıştır. Kullanılan protokol Çizelge 5.8 ve Çizelge 5.9' da yer almaktadır. Cihaz renk ayarları Cy 5.5 (498-660) olarak ayarlanmıştır. Bu da kullanılan kit ile sadece *NOS* terminatörünün tespit edilebildiği anlamına gelmektedir.

Çizelge 5.8 GDO taraması için Kantitatif Real-Time PCR protokolü-1

Program İsmi	**Döngü Sayısı**	**Analiz Modu**
Ön İnkübasyon	1	--
Uzama	45	Kantifikasyon
Soğutma	1	--

Çizelge 5.9 GDO taraması için Kantitatif Real-Time PCR protokolü-2

	Sıcaklık °C	**Mod**	**Süre (sa:dk:ss)**	**Hız (°C/s)**
Ön İnkübasyon				
Basamak 1	37	--	00:02:00	4.4
Basamak 2	95	--	00:10:00	4.4
Uzama				
Basamak 1	95	--	00:00:10	4.4
Basamak 2	60	Tek	00:00:30	2.2
Basamak 3	72	--	00:00:15	4.4
Soğutma				
	40	--	00:00:30	2.2

Yapılan *NOS* tarama çalışmasında referans olarak bitki geni tespiti yapılmıştır. Çalışmada elde edilen *NOS* terminatör geni çoğalma verileri referansa göre normalize edilmiştir (Denklem 5.4). Ardından kontrol olarak kullanılan kalipratör DNA' ya göre oranlanarak oransal miktar hesaplanmıştır (Denklem 5.5) [86].

$$\text{Miktar} = 2^{\Delta Ct} \tag{5.4}$$

$$R = \frac{2^{\Delta Ct_{örnek}}\left(Ctref - Ctörnek\right)}{2^{\Delta Ct_{kontrol}}\left(Ctref - Ctkontrol\right)} \tag{5.5}$$

R= Oransal miktar

ΔCt= Döngü sayısı farkı

5.3.4 Kantitatif GDO Analizi

Kantitatif analiz kantitatif Real-Time PCR kullanılarak yapılmıştır. Analiz için hazırlanan 96 kuyucuklu kaplar Light-Cycler 480 Real-Time sisteminde incelenmeye alınmıştır. PCR protokolü Çizelge 5.10 ve Çizelge 5.11' de yer almaktadır. Deneyde red 640 (483-640) renk aralığı kullanılmıştır.

Çizelge 5.10 Kantitatif GDO analizi için Kantitatif Real-Time PCR protokolü-1

Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu
Ön İnkübasyon	1	--
Uzama	45	Kantifikasyon
Soğutma	1	--

Çizelge 5.11 Kantitatif GDO analizi için Kantitatif Real-Time PCR protokolü -2

	Sıcaklık ^{o}C	Mod	Süre (sa:dk:ss)	Hız (^{o}C/s)
Ön İnkübasyon				
Basamak 1	95	--	00:10:00	4.4
Uzama				
Basamak 1	95	--	00:00:10	4.4
Basamak 2	60	Single	00:00:30	2.2
Basamak 3	72	--	00:00:15	4.4
Soğutma				
	40	--	00:00:30	2.2

Soya tohumlarında *35S* promotoru tespiti yapılan örneklerde mutlak miktar analizleri Denklem 5.2 kullanılarak hesaplanan verimlerden yararlanılarak Denklem 5.6' ya göre yapılmıştır [86].

$$GDO_{Oran} = \frac{(Verim_{hedef})^{\Delta Ct\ddot{o}rnek(Kontrol-\ddot{o}rnek)}}{(Verim_{referans})^{\Delta Ctreferans(Kontrol-\ddot{O}rnek)}} \qquad (5.6)$$

Verim= Kantitatif Real-Time PCR' ın verimi

ΔCt= Döngü sayısı farkı

GDO pozitif sonuç veren Adana menşeli tohumlar kullanılarak yapılan bisküvide *35S* promotor geninin varlığının ve miktarının tespiti amacıyla Çizelge 5.10 ve 5.11' de gösterilen protokollerden yararlanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen veriler kullanılarak (Denklem 5.7) ürünün GDO miktarı ile Adana' dan alınan örneğin GDO miktarı oranlanmıştır (Çizelge 6.8).

Miktar = 2^{-Ct} (5.7)

Ct = Döngü sayısı

BÖLÜM 6

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1 DNA İzolasyonu ve Verimi

DNA izolasyonu ticari bir kit olan Wizard Genomics DNA Purification kit [19] kullanılarak yapılmıştır. Ortaya çıkabilecek hataları indirgeme adına ticari bir kitten yararlanılmıştır. Tüm örneklerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra izolasyonu yapılan örnekler Nano-Drop Spektrofotometrisi' nde ve Agaroz Jel Elektroforezi' nde incelenmiştir.

6.1.1 Spektrofotometre ile Ölçüm

DNA izolasyonu yapılan örnekler Nano-Drop Spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Çıkan sonuçlar Çizelge 6.1' de gösterildiği gibidir. Ekstraksiyonun ardından spektrofotometre ile yapılan analizde 260/280 nm dalga boyundaki ölçümlerde soya örneklerinde 1.20-1.80 aralığında değerler tespit edilmiştir (Çizelge 6.1). Ayrıca, bisküvi örneğinde 260/280 nm dalga boyunda 1.85-2.00 aralığında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 6.2). Bilindiği üzere 260 ve 280 dalga boyunda okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermekte ve saflaştırılmış DNA' da 260/280 nm oranı yaklaşık 1.75-1.80' in üzerinde olmaması gerektiğinden [35] çalışmada bazı örneklerin bu değerin altında yer aldığı tespit edilmiştir. DNA verimindeki dalgalanmaların tohumlarda öğütme işleminin veriminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca tohumda ekstraksiyon sırasında pellet oluşurken üst kısımda bir tabaka gözlenmiştir (Şekil 5.2). Bu tabakayı giderme adına santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Üst fazın uzaklaştırılmasında bu tabakanın olumsuz etki yaptığı

düşünülmektedir. Ujhelyi vd. [17] yaptıkları çalışmada örneklerinin bir kısmında DNA veriminin düşük olduğunu bunun polisakkaridlerden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmada karşılaşılan bu tabakanın polisakkarid bir yapıda olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 6.1 Soya tohumlarına spektrofotometre ile yapılan analizin sonuçları

Örnekler	**Yoğunluk (ng/µl)**	**260/280 nm**	**260/230 nm**
Adana	380.8	1.26	0.52
Osmaniye	599.3	1.15	0.29
Samsun	191.2	1.43	0.64
Mersin	522.5	1.08	0.25
Hatay	392.2	1.16	0.54
Kahramanmaraş	496	1.11	0.75
Elazığ	358.2	1.65	0.79
Şanlıurfa	92.1	1.56	1.12
Malatya	382.9	1.57	0.72
Konya	38.2	1.40	0.83
Erzincan	112	1.45	0.59
Sakarya	106	1.27	0.45
Bingöl	45.2	1.70	0.98
Tekirdağ	138.8	1.70	1.09
İstanbul-1	176.1	1.73	1.14
İstanbul-2	572.9	1.85	1.19

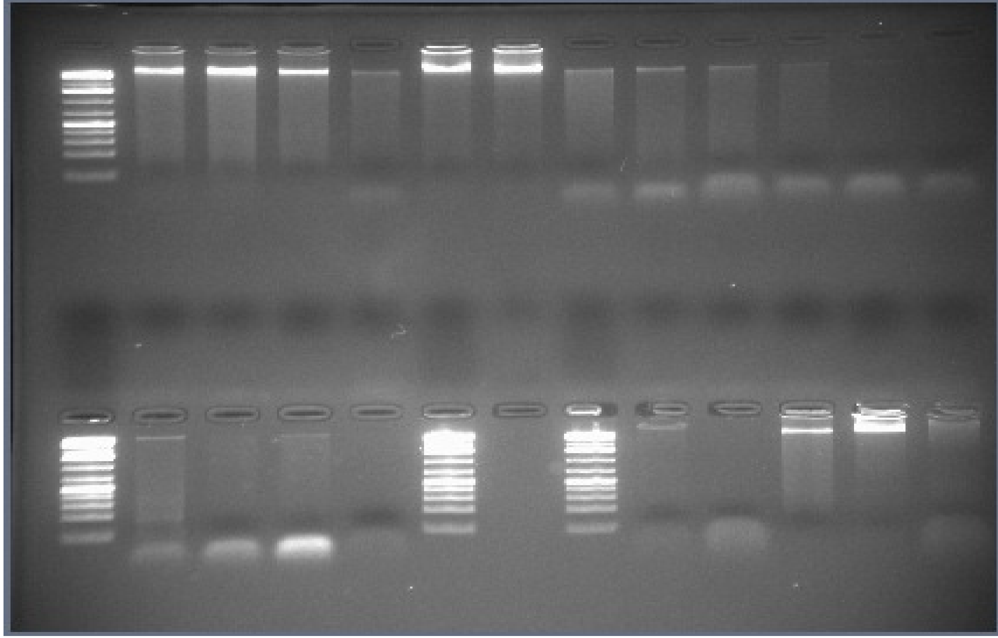
Çizelge 6.2 Bisküviden elde edilen DNA’ nın spektrofotometre ile yapılan analizinin sonuçları

Örnek	**Yoğunluk (ng/µl)**	**260/280 nm**	**260/230 nm**
Bisküvi	176.9	2.02	2.21

6.1.2 Agaroz Jel Elektroforezi Ölçümü

Soya örneklerinden elde edilen DNA’ nın varlığını ve saflığını kontrol etmek amacıyla tüm soya örnekleri Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmiştir. DNA örneklerinin jelde yürürken bulanık veya parlak bant şeklinde görünümü DNA saflığı hakkında bilgi

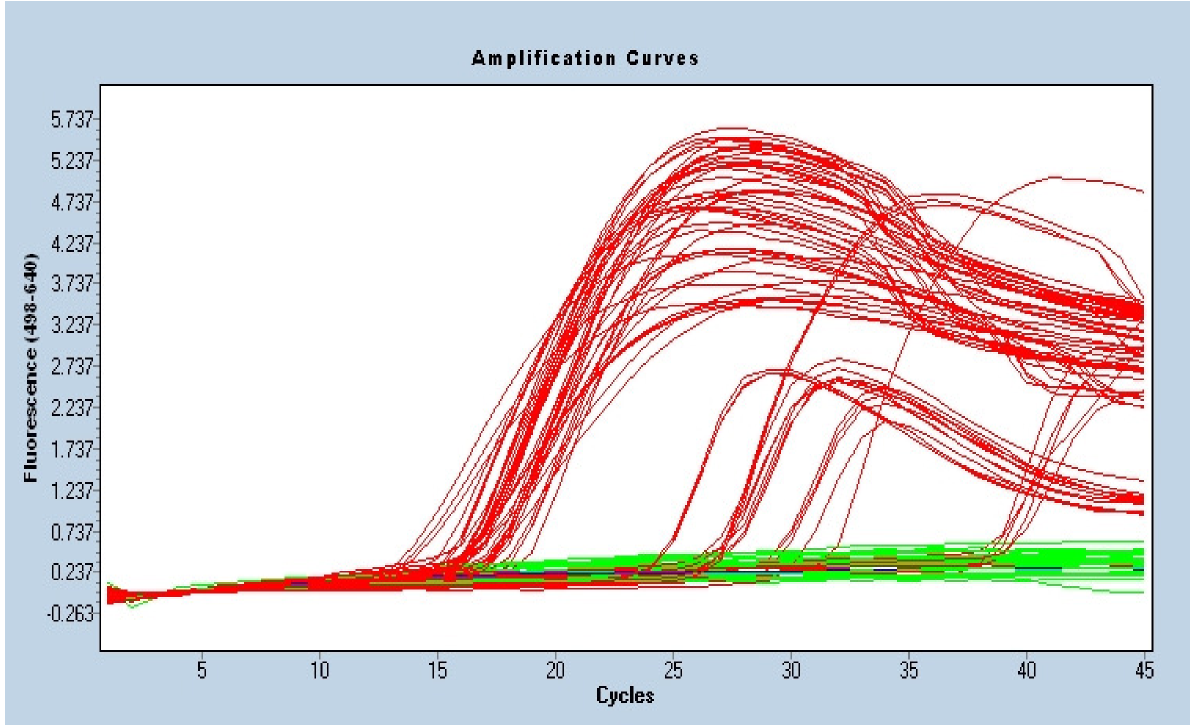
vermektedir. Bu doğrultuda, yapılan analiz sonucunda tüm örneklerde DNA' nın parlak bantlar oluşturması ile örneklerin nispeten saf olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1 DNA ekstraksiyonu yapılan örneklerin agaroz jelde analizi

6.2 GDO Tarama Analizi

Türkiye' nin 14 farklı ilinde ekimi yapılan soya tohumları ve İstanbul Kuru Gıdacılar Halinden satın alınan 2 farklı örnekte Kantitatif Real-Time PCR ile *NOS* terminatörü taraması yapılmıştır. Sonuçlara bakıldığında Adana, Hatay, Elazığ, Şanlıurfa, Malatya, Konya, Sakarya, Bingöl ve Tekirdağ' dan alınan örneklerde *NOS* geni tespit edilmiştir (Çizelge 6.3). Bu incelenen örneklerin %56.3' ünde *NOS* geni tespiti anlamına gelmektedir. Osmaniye, Samsun, Mersin, Kahramanmaraş, Erzincan ve İstanbul' dan alınan örneklerde *NOS* geninin çoğalmadığı gözlenmiştir. Bununla beraber, bu örneklerde *NOS* geninin çoğalmadığı halde referans geninin çoğalması deneyin doğru şartlar sağlanarak yapıldığı ancak soyalarda GDO' nun olmadığını göstermektedir.



Şekil 6.2 *NOS* terminatörü tarama sonuç eğrileri

Çizelge 6.3 Kantitatif Real-Time PCR *NOS* geni tarama sonuçları

Örnek	**Ortalama *NOS* Ct**	**Ortalama Ref. Ct**
Adana	26,15±0,8	15,87±1,06
Osmaniye		16,77±0,55
Samsun		15,01±0,03
Mersin		15,81±0,05
Hatay	28,14±0,04	17,72±0,05
Kahramanmaraş		16,20±0,09
Elazığ	35,78±3,61	16,50±0,05
Şanlıurfa	23,33±0,08	13,31±0,09
Malatya	37,38	17,22±0,02
Konya	37,80	15,46±1,0
Erzincan		16,56±0,32
Sakarya	34,78±4,50	15,53±0,04
Bingöl	37,44	17,67±0,91
Tekirdağ	25,76±0,05	16,03±0,07
İstanbul-1		16,83±0,01
İstanbul-2		28,32±2,76
Kontrol	28,26±0,42	30,09±0,36

Türkiye' nin 14 farklı ilinde ekimi yapılan soya tohumları ve İstanbul Kuru Gıdacılar Halinden satın alınan iki farklı örnekte Kantitatif Real-Time PCR ile *35S* promotoru tarama sonucuna göre Adana, Hatay, Şanlıurfa, Konya, Sakarya, Bingöl ve Tekirdağ' dan alınan örneklerde bu genin varlığı tespit edilmiştir.

On altı farklı soya tohumunda yapılan *NOS* terminatör geni ve *35S* promotor geni tarama sonuçlarına göre yedi tanesinde her iki genin varlığı tespit edilmiştir. Ancak Elazığ ve Malatya' dan alınan örneklerde sadece *NOS* terminatörüne rastlanmış ancak *35S* promotoru gözlenmemiştir. Bu durum sadece 7 örnekte genin ekspresyonunu rastlanmıştır.

Çizelge 6.4 *NOS* terminatör ile *35S* promotor tarama sonuçları

Örnek	**Ct *NOS* Ort.**	**Ct Ref (Ort.**	**Ct *35S* Ort**	**Ct Ref (*LEKTİN*) Ort.**
Adana	26,15±0,8	15,87±1,06	26,05	25,75±0,10
Osmaniye		16,77±0,55		26,2±0,01
Samsun		15,01±0,03		24,29±0,23
Mersin		15,81±0,05		24,75±0,02
Hatay	28,14±0,04	17,72±0,05	29,38±0,007	27,02±0,13
Kahramanmaraş		16,20±0,09		27,84±0,06
Elazığ	35,78±3,61	16,50±0,05		28,74±0,46
Şanlıurfa	23,33±0,08	13,31±0,09	22,14±0,03	22,21±0,07
Malatya	37,38	17,22±0,02		25,84±0,21
Konya	37,80	15,46±1,0	39,99	21,64±1,36
Erzincan		16,56±0,32		23,52±0,07
Sakarya	34,78±4,50	15,53±0,04	37,27±2,91	22,84±0,71
Bingöl	37,44	17,67±0,91	37,20±1,39	22,2±1,04
Tekirdağ	25,76±0,05	16,03±0,07	29,34±0,31	24,12±0.07
İstanbul-1		16,83±0,01		25,39±0,11
İstanbul-2		28,32±2,76		32,07±0,15
Kontrol	28,26±0,42	30,09±0,36	21,795±0,03	22,145±0,007

6.3 GDO Miktar Analizi

Türkiye’ nin 14 farklı ilinden toplanan soya tohumları, İstanbul Kuru Gıdacılar Halinden satın alınan 2 farklı örnekte ve Adana menşeili tohumlardan yapılan bisküviden elde edilen DNA’ nın Kantitatif Real-Time PCR kullanılarak *NOS* terminatörü ve *35S* promotor genlerinin oransal ve mutlak miktarları belirlenmiştir.

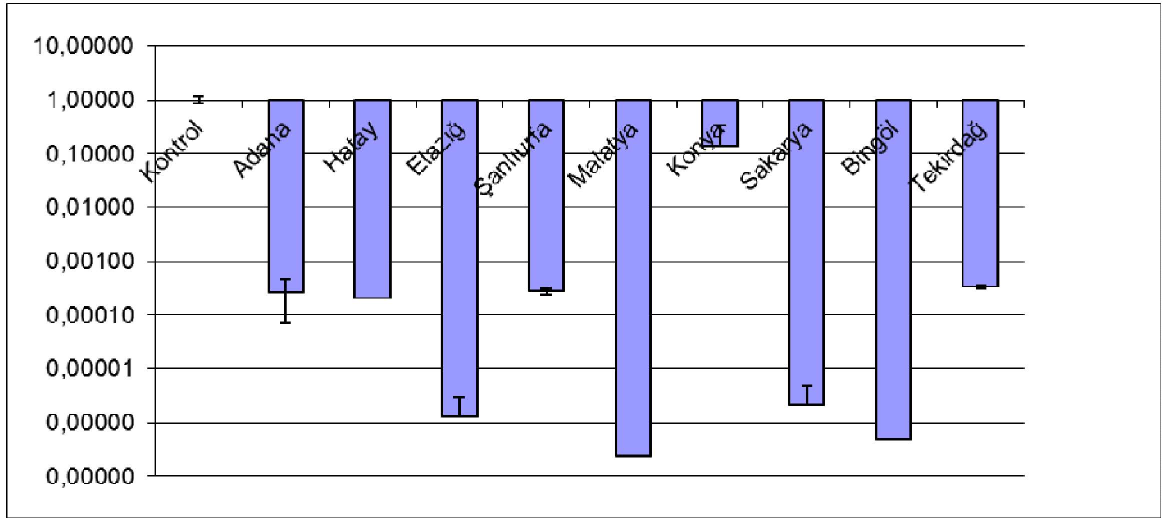
6.3.1 Soya Tohumların için Oransal Miktar Analizi

Yapılan *NOS* tarama çalışmasında elde edilen sonuçlar bitki geni referans alınarak normalize edilmiş (Denklem 5.1) olup analizde kontrol olarak kullanılan kalipratör DNA’ ya göre oranlanmıştır (Denklem 5.2) [86].

Çizelge 6.5 *NOS* geni kontrole göre oransal miktarı

Örnek	Oransal Miktar
Adana	0,0002597±0,000188
Hatay	0,0002064±0,000003
Elazığ	0,0000013±0,000002
Şanlıurfa	0,0002736±0,000032
Malatya	0,0000002
Konya	0,1410520±0,199477
Sakarya	0,0000021±0,000003
Bingöl	0,0000005
Tekirdağ	0,0003330±0,000029
Kontrol	1,0000000±0,156316

On altı farklı soyada yapılan *NOS* terminatör geni tarama sonucuna göre her bir örneğin farklı miktarlarda gen içerdiği saptanmıştır. Şekil 6.3’ de on altı farklı soyanın *NOS* terminatörünün kontrol DNA’ ya göre oransal miktarları gösterilmektedir. Buna göre örnekler içerisinde en fazla *NOS* terminatör geninin Adana, Hatay, Şanlıurfa, Konya ve Tekirdağ’ dan alınan soyalarda olduğu saptanmıştır.



Şekil 6.3 Soyaların kontrole oranla içerdikleri GDO miktarı

6.3.2 Soya Tohumları için Mutlak Miktar Analizi

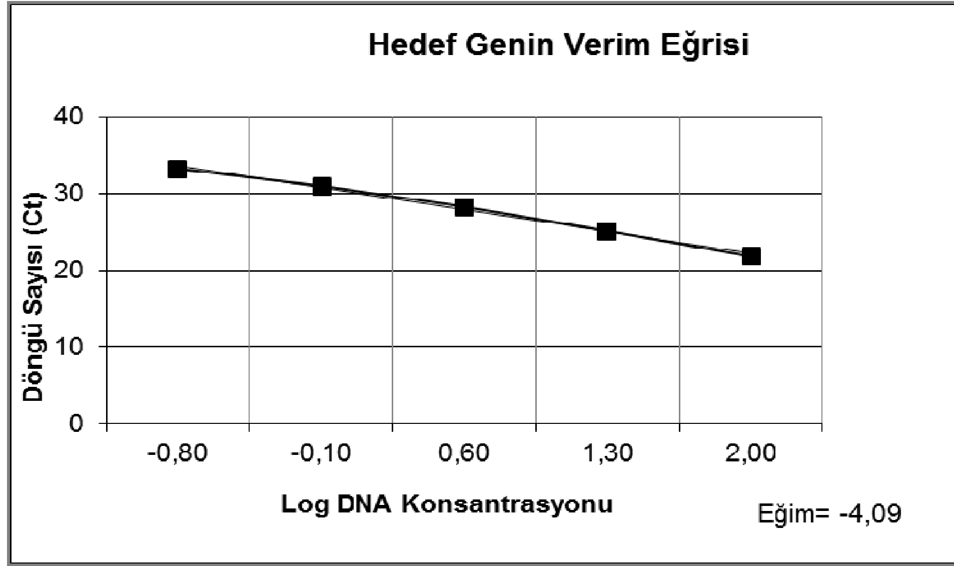
On altı farklı soya örneğinde *35S* promotor geninin mutlak miktarı hesaplanmıştır. Buna göre ilk olarak seri çözeltiler kullanılarak standart eğri grafiği çizilmiştir. Bulunan eğim değerlerinden yararlanılarak verim hesabı Denklem 5.2' ye göre yapılmıştır. *35S* promotor genin verimi 1.75, referans genin verimi 1.90 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 6.6 Seri çözeltilerin *35S* promotor gene göre verimlilik verileri

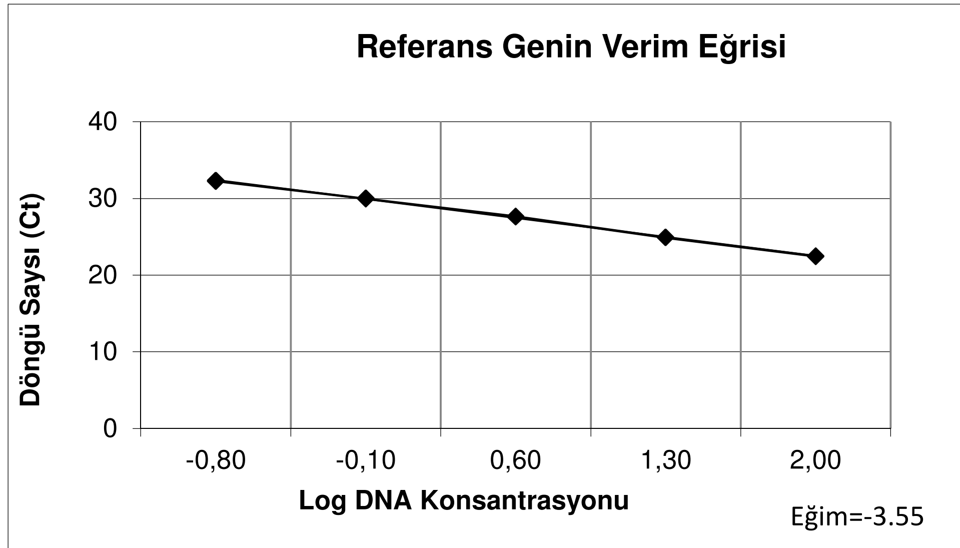
Çözeltiler	**Ortalama Ct *35S***	**Konsantrasyon (ng/ µl)**	**Konsantrasyonun Logaritması**
d0 t	21,795	100	2
d1 t	25,05	20	1,301029996
d2 t	28,24	4	0,602059991
d3 t	30,96	0,8	-0,09691001
d4 t	33,15	0,16	-0,79588002

Çizelge 6.7 Seri çözeltilerin referans gene (*LEKTİN*) göre verimlilik verileri

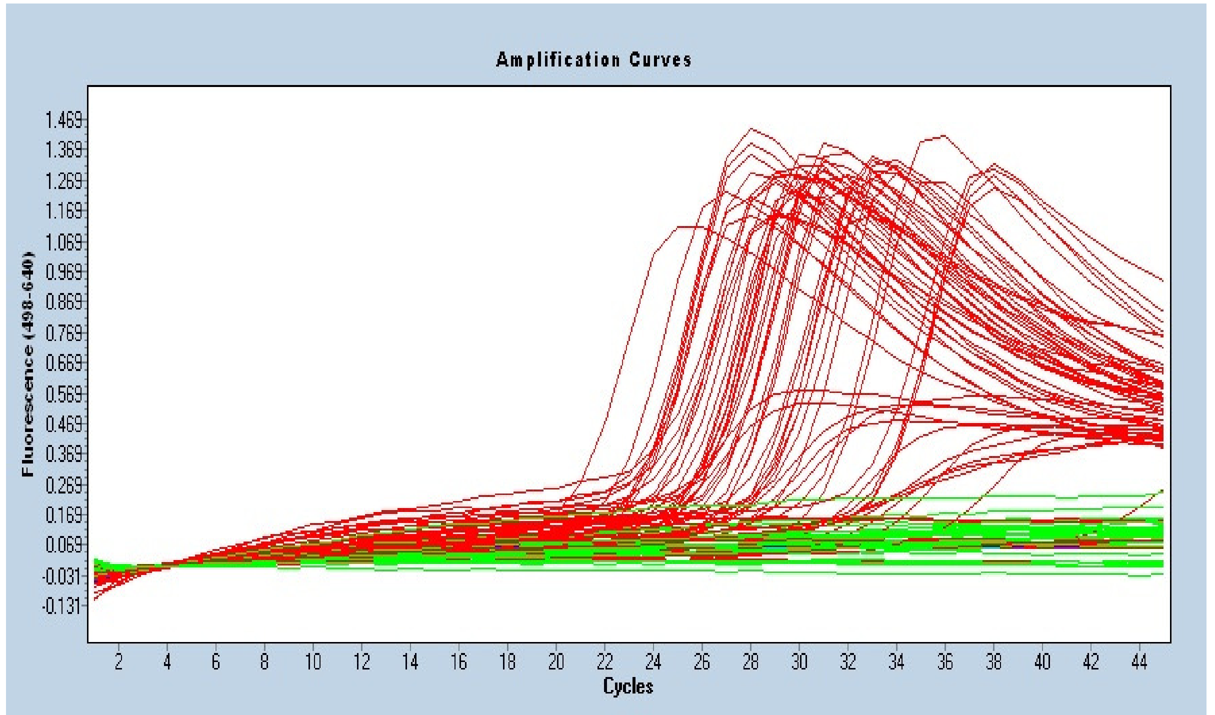
Çözeltiler	**Ortalama Ct Ref**	**Konsantrasyon (ng/ µl)**	**Konsantrasyonun Logaritması**
d0 r	22,43	100	2
d1 r	24,87	20	1,30103
d2 r	27,61	4	0,60206
d3 r	29,95	0,8	-0,09691
d4 r	32,28	0,16	-0,79588



Şekil 6.4 Seri çözeltilerin *35S* promotor genine göre verimlilik eğrisi



Şekil 6.5 Seri çözeltilerin referans gene göre verimlilik eğrisi



Şekil 6.6 Soya tohumlarında yapılan kantitatif analiz eğrileri

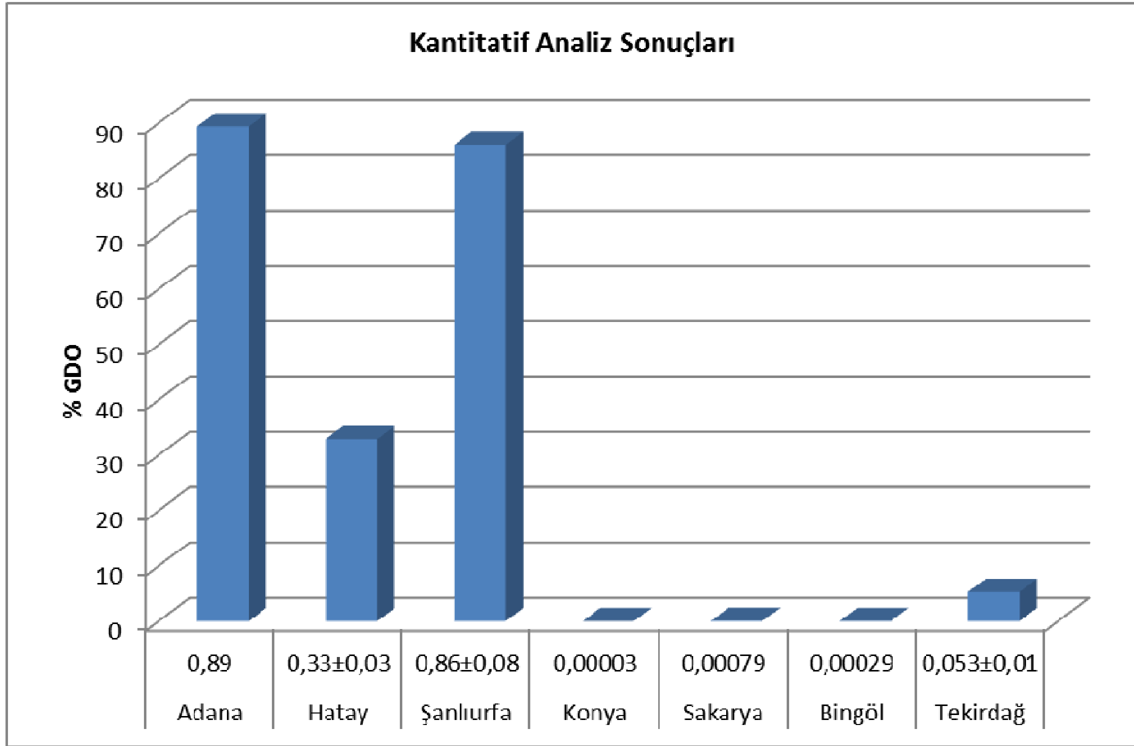
Soya tohumlarında yapılan kantitatif analiz sonucunda Kantitatif-Real Time PCR' da oluşan eğriler Şekil 6.6' da yer almaktadır. Yapılan analizde tüm örneklerde *LEKTİN* geni çoğalması gözlenmiştir. *35S* promotor geni çoğalan örneklerde mutlak miktar hesapları Denklem 5.6' dan yararlanılarak elde edilmiştir (Çizelge 6.8).

Çizelge 6.8 *35S* promotor geninin mutlak miktarı

Örnek	**GDO Oranı**	**%GDO**
Adana	0,89	89,386
Hatay	0,33±0,03	32,922
Şanlıurfa	0,86±0,08	86,123
Konya	0,00003	0,003
Sakarya	0,00079	0,079
Bingöl	0,00029	0,029
Tekirdağ	0,053±0,01	5,273

Mutlak kantifikasyon verileri göz önüne alındığında GDO oranının Adana ve Şanlıurfa' dan alınan örneklerde en yüksek seviyede olduğu gözlenmektedir. Hatay' dan alınan örnekte yaklaşık %33 oranında GDO tespiti yapılmakla beraber; Sakarya, Bingöl ve

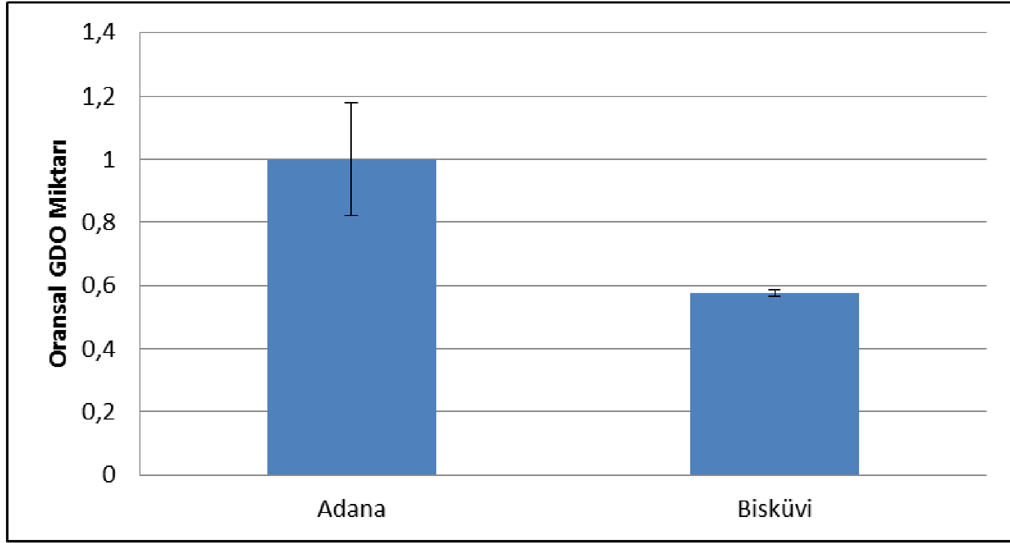
Tekirdağ' dan alınan örneklerde *35S* promotora bağlı GDO miktarı ihmal edilecek düzeydedir.



Şekil 6.7 Soya tohumlarında mutlak kantifikasyona bağlı veriler

6.3.3 Bisküvi için Oransal Miktar Analizi

Sıcaklığın GDO miktarına etkisini araştırmak için, GDO saptanan Adana' dan alınan soya tohumlarından elde edilen un ile Şekil 5.1' de gösterilen proses basamakları uygulanarak 2 mm kalınlığında bisküvi yapılmıştır. Yapılan bisküvilerden DNA izole edilerek *35S* promotor geni taranmıştır. Yapılan kantifikasyon analizleri sonucunda bisküviden alınan örneklerde Adana' dan alınan soya tohumlarına göre GDO miktarında %58 oranında istatistiksel olarak önemli derecede fark saptanmıştır ($P \leq 0.05$) (Şekil 6.8). Vijayakumar vd. yapmış oldukları deneyde ısıl işlem uygulamalarının DNA' da hasar oluşturarak GDO miktarında azalışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. Literatür çalışmalarıyla da doğru orantılı olarak yapılan bu çalışmada da sıcaklık artışı ile GDO miktarında azalmanın olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.8 Bisküvinin GDO miktarının Adana' dan alınan örneğe göre oranlanması

BÖLÜM 7

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada Türkiye' nin 14 farklı ilinden toplanan soya tohumları (Adana, Osmaniye, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş, Elazığ, Şanlıurfa Malatya, Konya, Erzincan, Sakarya, Samsun, Bingöl ve Tekirdağ) ve İstanbul-Kuru Gıda Hali' nden temin edilen 2 adet soya örneğinin GDO taraması yapılmıştır. GDO taramaları Kantitatif Real-Time PCR' da hibridizasyon probları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GDO pozitif sonuç veren Adana' dan alınan soya tohumundan elde edilen un ile yapılan bisküviden tekrar DNA izole edilerek gıda işlem prosesinde sıcaklığın GDO üzerine etkisi araştırılmıştır. Tüm deneyler sonunda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1- DNA ekstraksiyonunun ardından DNA verimini belirlemek amacıyla yapılan analizler özetlendiğinde; spektrofotometre ile yapılan çalışmada 260/280 nm dalga boyundaki ölçüm sonuçlarına göre soya örneklerinde 1.20-1.80, bisküvi örneğinde 1.85-2.00 aralığında değerler tespit edilmiştir. Yapılan Agaroz Jel Elektroforezi' nde tüm örneklerde parlak DNA bantları gözlenmiştir.

2- GDO tarama ve kantitatif analiz sonuçları özetlendiğinde; analiz edilen tüm örneklerde referans gen ve kontrol gende çoğalma gözlenmiştir. İncelenen 16 örnekten 9 tanesinde (Adana, Hatay, Elazığ, Şanlıurfa, Malatya, Konya, Sakarya, Bingöl ve Tekirdağ' dan alınan örneklerde) *NOS* terminatörü tespit edilmiştir.

NOS terminatör geni tespiti yapılan örneklerin kontrol DNA' ya göre oransal miktarları incelendiğinde Adana, Hatay, Şanlıurfa, Konya ve Tekirdağ' dan alınan soya örneklerinin en fazla *NOS* terminatör geni içerdikleri tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında *35S* promotor gen varlığı tespit edilip mutlak gen miktarı hesaplanmıştır. Reaksiyonların verimi, *35S* promotor geni için 1.75, *LEKTİN* geni için 1.90 olarak hesaplanmıştır. Analizde tüm örneklerde referans ve kontrol genlerinde çoğalma gözlenmiştir. *35S* gen çoğalması Adana, Hatay, Şanlıurfa, Konya, Sakarya, Bingöl ve Tekirdağ' dan alınan örneklerde gözlenmektedir.

Çalışmada 16 örnek incelenmiş olup bunlardan 7 tanesinde hem *35S* hem de *NOS* genlerine rastlanmıştır. İncelenen örneklerin yaklaşık %44' ünde GDO tespiti yapılmıştır.

35S promotor geni için mutlak gen miktarı hesaplandığında Adana' dan alınan örneğin yaklaşık %89 GDO oranı ile en yüksek GDO miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, Hatay, Şanlıurfa, Konya, Sakarya, Bingöl ve Tekirdağ' dan toplanan örneklerde GDO oranı sırasıyla %32.922, %86.123, %0.003, %0.079 ve %0.029, %5.273 değerlerinde olduğu tespit edilmiştir.

3- Adana ilinden toplanan soya tohumları kullanılarak üretilen bisküviler için yapılan analiz sonuçları özetlendiğinde; *LEKTİN* geninde ve kontrol gende çoğalma gözlenmiştir. Adana' dan alınan soyaya göre yapılan oransal analizde bisküvinin GDO miktarında %58 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde "Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik" ile "Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik" gereğince genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi sınırlandırılmıştır. Ancak yapmış olduğumuz çalışmada, Anadolu' da piyasaya sürülen örneklerin %44' ünde GDO tespit edilmiştir. Bu çalışma ile GDO tarımıyla ilgili kontrollerin etkinliğinin arttırılması gerektiği ortaya çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

[1] Türkoğlu, S., (2007). Screening of Tomato Seeds for Genetic Modification and Identification of Genetically Modified Ripening Delayed Tomato Seeds, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[2] Uçkun, E., (2007). Screening for Genetically Modified Tomatoes & Tomato Seeds and Identification of *CRY1AC* and *SAM-K* Specific Modifications Using Gene and Construct Specific PCR, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[3] Ertuğrul, A., (2006). Development and Application of Techniques on Molecular Analysis of Genetically Modified Products, Yüksek Lisans Tezi, Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[4] Turhan, A., (2008). Soya ve Mısırda Genetiği Değiştirilmiş Ürünlerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

[5] Bogani, P., Minunni, M., Spiriti, M.M., Zavaglia, M., Tombelli, S., Buiatti, M. ve Mascini,M., (2009). "Transgenes Monitoring in An Industrial Soybean Processing Chain by Dna-Based Conventional Approaches and Biosensors", Food Chemistry, 113:658–664.

[6] Pinto, A.D., Alfano, F., Giordano, A., Capuano, F., Valentina, T. ve Tantillo, G., (2008). "Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Presence of Genetically-Modified Maize in Breaded ''Ready-to-Cook'' Food Products", Food Control, 19:1002–1005.

[7] Brod, F.C.A., Ferrari, C.S., Valente, L.L ve Arisi, A.C.M., (2007). "Nested PCR Detection of Genetically Modified Soybean in Soybean Flour, Infant Formula and Soymilk", LWT 40:748–751.

[8] Lee, B., Kim, C.G., Park, J.Y., Park, K.W., Kim, H.J, Yi H., Jeong, S.C., Yoon, W.K ve Kim, H.M., (2009). "Monitoring the Occurrence of Genetically Modified Soybean and Maize in Cultivated Fields and Along the Transportation Routes of The Incheon Port in South Korea", Food Control, 20:250–254.

[9] Abdullah, T., Radu S., Hassan, Z. ve Hashim, J.K., (2006). "Detection of Genetically Modified Soy in Processed Foods Sold Commercially in Malaysia by PCR-Based Method, Food Chemistry, 98:575–579.

[10] Kakihara, Y., Matsufuji, H., Chino, M. ve Yamagata, K., (2007). "Detection of Recombinant DNA of Genetically Modified (GM) Soybeans in Heat-Treated GM Soybeans and Commercial Natto", Food Control, 18:1289–1294.

[11] Moriuchi, R., Monma, K., Sagi, N., Uno, N. ve Kamata, K., (2007). "Applicability of Quantitative PCR to Soy Processed Foods Containing Roundup Ready Soy", Food Control, 18:191–195.

[12] Joana, Costa, J., Mafra I., Amaral, J.S. ve Oliveira, M.B.P.P., (2010). "Monitoring Genetically Modified Soybean along the Industrial Soybean Oil Extraction and Refining Processes by Polymerase Chain Reaction Techniques", Food Research International, 43:301–306.

[13] Zhang, M., Gao, X., Yu Y., Ao, J., Qin, J., Yao, Y. ve Li, Q., (2007). "Detection of Roundup Ready Soy in Highly Processed Products by Triplex Nested PCR", Food Control, 18:1277–1281.

[14] Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C. ve Willmund, R., (1999). "Quantitative Analysis of Genetically Modified Organisms (GMO) İn Processed Food by PCR-Based Methods", Food Control, 10:385-389.

[15] Ajdukovic, T.K., Nikolic, Z., Vujakovic, M., Milosevic, M., Ignjatov, M. ve Petrovic, D., (2009). "Detection of Genetically Modified Organisms in Processed Meat Products on The Serbian Food Market", Meat Science, 81:230–232.

[16] Forte, V.T., Pinto, A.D., Martino, C., Tantillo, G.M., Grasso, G. ve Schena, F.P., (2005). "A General Multiplex-PCR Assay for the General Detection of Genetically Modified Soya and Maize", Food Control, 16:535–539.

[17] Ujhelyi, G., Vajda, B., Beki, E., Neszlenyi, K., Jakab, J., Janosi, A., Nemedi, E. ve Gelencser, E., (2008). "Surveying the RR Soy Content of Commercially Available Food Products in Hungary", Food Control, 19:967–973.

[18] Nikolic´, Z., Ajdukovic, K.T., Jevtic, A. ve Marinkovic, D., (2009). "Detection of GM Soybean in Food Products by Simultaneous Employment of Three Pairs of PCR Primers", Food Research International, 42:349–352.

[19] Greiner, R. ve Konietzny, U., (2008). "Presence of Genetically Modified Maize and Soy in Food Products Sold Commercially in Brazil From 2000 to 2005", Food Control, 19:499–505.

[20] Dinon, A.Z., Treml, D., Mello, C.S. ve Maisonnave, Arisi A.C.M., (2010). “Monitoring of GMO in Brazilian Processed Meat and Soy-Based Products from 2007 to 2008”, Journal of Food Composition and Analysis, 23:226–229.

[21] Vijayakumar, K.R., Martin, A., Gowda, L.R. ve Prakash, V., (2009). “Detection of Genetically Modified Soya and Maize: Impact of Heat Processing”, Food Chemistry, 117: 514–521.

[22] Firidin, Ş., (2010). “Rekombinant DNA Teknolojisi”, Yunus Araştırma Bülteni, 2:16-18.

[23] Demir, A., Seyis, F. ve Kurt, O., (2006), “Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar: 1. Bitkiler”, Journal. of Faculty. of Agricalture, 21 (2):249-260.

[24] Erzincanlı, H.O., (2006). Tarımda Genetik Olarak Değiştirilmiş Organizmalar ve Bunların Belgelendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü), İzmir.

[25] Gözükırmızı, N., Oğraş,T., Aydın, Y., Hasançebi, S., Ertuğrul F., Yumurtacı, A. ve Uncuoğlu A.A, (2008). “Bitkilerde Biyoteknolojik Uygulamalar”, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Grup Toplantısı, 26-30 Mayıs 2008, Kocaeli.

[26] Access Excellence Resource Center, www.accessexcellence.org, 11.10.2011.

[27] Forman, L.E., (2009). Genetically Modified Foods, First Edition, ABDO Publishing Co., Minnesota.

[28] Bayraç, A.T., Kalemtaş, G., Baloğlu, C.M. ve Kavas, M., (2007). Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar, 1. Baskı, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş., Ankara.

[29] Yıldırım, A.N., (2006). Genetiği Değiştirilmiş Ürünlerin Mevcut Yapısı ve Adana’ daki Tüketicilerin Bilgi Düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

[30] Babaoğlu, M., (1999). “Bitkilerde Gen Transferi Teknikleri”, Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi, 322: 24-26.

[31] Uncuoğlu, A.A., Oğraş, T.T., Yavuz, H., Denizli, A. ve Memon, A., (2008). “Bitkilere Gen Aktarımı”, Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi, 2-15.

[32] Soysal, İ.M., (2006), Rekombinant DNA Teknolojisi, http://misoysal.nku.edu.tr/admin/userfiles/9_%20Bolum.pdf, 10 Aralık 2011.

[33] Gözükırmızı, N., (2008), Biyoloji Araştırmaları, Moleküler Boyutu ve Önceliklerimiz,http://maycalistaylari.comu.edu.tr/calistay2008/sunumlar/konferans/nermingozukirmizi2.pdf, 8 Aralık 2011.

[34] Primrose, S.B. ve Twyman R.M., (2006). Principles of Gene Manipulation and Genomics, Seveth Edition, Blackwell Publishing, Oxford.

[35] Temizkan, G. ve Arda, N., (2008). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

[36] Arda, M., (2007), Klonlamada Kullanılan Vektörler, http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx, 20 Ekim 2011.

[37] Arslan, K. ve Akyuz B., (2009), "Gen Transfer Teknolojileri", Erciyes Üniversitesi Veterinerli Fakültesi Dergisi, 6(1):77-82.

[38] Çiçek, O., (2008). İlköğretim Okullarında Görevli Öğretmenlerin Transgenik Ürünler (GDO) Konusundaki Bilgilerinin ve Görüşlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[39] TÜSİAD, (2006). Uluslararası Rekabet Stratejileri Türkiye'de Biyoteknoloji İşbirlikleri TÜSİAD Rekabet Stratejiler Dizisi-9, 06-421, İstanbul.

[40] Purchase, I.F.H., (2005). "What Determines the Acceptability of Genetically Modified Food That Can Improve Human Nutrition", Toxicology and Applied Pharmacology, 207:19-27.

[41] Wright, A. ve Bruce, A., (2003). "Genetically Modified Microorganisms and Their Potential Effects on Human Health and Nutrition", Food Science & Technology, 14:264-276.

[42] Kurt, O. ve Şavşatlı, Y., (2005). "Bitkisel Biyoteknolojiye Genel Bir Bakış", OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 20(3):126-133.

[43] Roller, S. ve Harlander, S., (1998). Genetic Modification in the Food Industry, First Edition, Blackie Academic & Professional, London.

[44] Çelik, V. ve Balık, D., (2007), "Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar", Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 23 (1-2):13 – 23.

[45] Ekinci, M.S., Akyol, İ., Karaman, M. ve Özköse, E., (2005). "Hayvansal Biyoteknoloji Uygulamalarında Güncel Gelişmeler", Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2).

[46] Akman, S.B., (2007). Avrupa Birliği'nin Biyoteknolojik Ürün ve Uygulamalara Yönelik Tüketici Politikası ve Türkiye'nin Uyumu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

[47] Çetiner, S. ve Önal, S., (2004). "Modern Biyoteknoloji, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Gıda Güvenliği", Modern Biyoteknoloji, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Gıda Güvenliği Konferansı, 6 Aralık 2004, İstanbul.

[48] Kulaç, İ., Ağırdil, Y. ve Yakın, M., (2006). "Sofralarımızdaki Tatlı Dert, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Halk Sağlığına Etkileri", Türk Biyokimya Dergisi, 31 (3):151–155.

[49] Kıymaz, T. ve Tarakçıoğlu, M., (2002), Biyoteknoloji Alanındaki Gelişmelerin Yansımaları ve Türkiye' nin Politika Seçenekleri, http://ekutup.dpt.gov.tr/planlama/42nciyil/kiymazt.pdf, 9 Ağustos 2011.

[50] Ölçer, Ö., (2001). "Transgenik Bitkiler: Tarımsal Uygulamaları, Üretim ve Tüketiminin Kontrolü", Çevkor, 40:21-24.

[51] DPT, (2000). Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Yayın No:2515, Ankara.

[52] Sökmen, M., (2005). "Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitkiler ve Bitki Koruma Amaçlı Kullanımı", OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20(3):105-109.

[53] Taylor, S.L., (1997). "Food from Genetically Modified Organisms and Potential for Food Allergy", Environmental Toxicology and Pharmacology, 4:121–126.

[54] Green, P.J., (2002). Introduction to Food Biotechnology, First Edition, CRC Press, Newyork.

[55] Franks, J.R., (1999). "The Status and Prospects for Genetically Modified Crops in Europe", Food Policy 24:565–584.

[56] Ergen, M., (2009). Organik Beslenme ve Gıda Terörü, 1. Baskı, Günizi Yayıncılık, İstanbul.

[57] Ruse, M. ve Castle, D., (2002). Genetically Modified Foods, First Edition, Prometheus Books, Newyork.

[58] Celec, P., Kukucková, M., Renczésová, V., Natarajan S., Pálffy, L., Gardlík, R., Hodosy, J., Behuliak, M., Vlková, B., Minárik, G., Szemes, T., Stuchlík ve S., Turna, J., (2005). "Biological and Biomedical Aspects of Genetically Modified Food", Biomedicine & Pharmacotherapy, 59:531– 540.

[59] TÜSİAD, (2006). Uluslararası Rekabet Stratejileri: Türkiye' de Biyoteknoloji İşbirlikleri, Yayın No: 06-421, İstanbul.

[60] Vujaklija, D., (2006). "An Introduction to GMO", Toxicology Letters, 16:1–324.

[61] Haguenauer, O.C., (2007). “Gene Therapy: Regulatory Issues and International Approaches to Regulation”, Biotechnolog, 8:361-369.

[62] Gay, P.B. ve Gillespie, S.H., (2005). “Antibiotic Resistance Markers in Genetically Modified Plants: A Risk to Human Health?”, Lancet Infect Dis, 5: 637–46.

[63] Uzogara, S.G., (2000). “The Impact of Genetic Modification of Human Foods in The 21st Century: a Review”, Biotechnology Advances, 18:179–206.

[64] Breckling, B., Reuter, H., Middelhoff, U., Glemnitz, M., Wurbs, A., Schmidt, G., Schroder W. ve Windhorst W., (2006). “Risk Indication of Genetically Modified Organisms (GMO): Modelling Environmental Exposure and Dispersal Across Different Scales Oilseed Rape in Northern Germany as an Integrated Case Study”, Ecological Indicators, 479:6.

[65] Tzotzos G.T., (1995). Genetically Modified Organisms, First Edition, CAB International, Oxfordshire.

[66] ISAAA, Global Status of Commercialized Biotech Crops, http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/, 12 Aralık 2011.

[67] Demirkol, K., (2010). GDO: Çağdaş Esaret, Birinci Basım, Kaynak Yayınları, İstanbul.

[68] T.C. Resmi Gazete, Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik. (27671), 13.05.2010, 3,4.

[69] The European Parliament and the Council, Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use, http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline, 12 Aralık 2011.

[70] Esen, L., (2006). An Analysis of the Difference and Dispute Between the European Union and the United States on Genetically Modified Organisms (GMOs): The Case for the WTO, Marmara Üniversitesi Avrupa Topluluğu Enstitüsü, İstanbul.

[71] T.C. Resmi Gazete, Gıda Ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik. (27388), 26.10.2009, 1-6.

[72] Aslan, D. ve Şengelen M., (2010). Farklı Boyutlarıyla Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar, Birinci Baskı, Mattek Matbaacılık, Ankara.

[73] Karamollaoğlu, İ., (2007). Development of Qcm Based DNA Biosensors for Detection of Genetically Modified Organisms, Doktora Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[74] Heller, K.J., (2006). Genetically Engineered Food: Methods and Detection, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co., Mörlenbach.

[75] Türkyılmaz, S., ve Esendal, Ö.M., (2002). "Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları", Kafkas Üniv. Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 8(1):71-76.

[76] Weirich, P., (2007). Labeling Genetically Modified Food, First Edition, Oxford University Press, Oxford.

[77] Yılmaz, S., ve Devran Z., (2003), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları, http://www.batem.gov.tr/yayinlar/derim/2003/31-42.pdf, 10 Aralık 2011.

[78] Ceyhan, C.O., (2005), Polimeraz Zincir Reaksiyonu, http://www.gazete.itu.edu.tr/mart/4genetik.pdf, 9 Kasım 2011.

[79] Lees, M., (2003). Food Authenticity and Traceability, First Edition, Woodhead Publishing, Cambridge.

[80] Güllüce, A., (2009). Farklı Hayvan Türlerinin Isıl İşlem Uygulanmış Et Karışımlarında Real-Time PCR Tekniği ile Tespit Edilmesi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

[81] Gürsoy, O., (2000). Soya Sütünün Kaşar Peyniri Üretiminde Kullanım Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.

[82] Bayar, R. ve Yılmaz, M., "Türkiye' de Soya Fasulyesi ve Önemi", (2004), Uluslararası İnsan Bilimleri Dergisi, 1303-5134.

[83] Kocatürk, M. ve Kaya, N., (2010), Soya, http://www.batem.gov.tr/urunler/tarlaurunleri/soya/soya.htm, 4 Ocak 2012

[84] Türkiye İstatistik Kurumu, (2010), Bitkisel Üretim İstatistikleri, www.tuik.gov.tr, 10.09.2011.

[85] Ahmed, F.E, (2004). Testing of Genetically Modified Organisms in Foods, First Edition, Haworth Press, Binghamton.

[86] Pfaffl, M.W., (2004). Quantification Strategies in Real-Time PCR, First Edition, International University Line, California.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Alime Gül GÖNEŞ

Doğum Tarihi ve Yeri : 05.03.1982 / Isparta

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : alimegones@hotmail.com

EĞİTİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Gıda Mühendisliği	İstanbul Teknik Üniversitesi	2005
Lise	Fen Bilimleri	Isparta Süleyman Demirel Fen Lisesi	2000

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2009	Ekonomi Bakanlığı	Ürün Denetmeni
2006	Başakşehir Belediyesi	Halkla İlişkiler Sorumlusu
2006	Aksuvital Doğal Ürünler	Gıda Mühendisi
2005	Kolaylar Tarım Ürünleri	Gıda Mühendisi
2004	İstanbul Halk Ekmek	Stajyer
2003	Pakize Tarzi Laboratuvarları	Stajyer